

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HR. KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita 1.

Alkaloids of the family Amaryllidaceae and their biological activity 1.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2014

Kamila Mišáková

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Hradec Králové

1. 5. 2014

.....

podpis

Děkuji Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D za poskytnuté materiály, vstřícný přístup a odborné rady při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Nině Benešové za odbornou pomoc při praktickém zpracování diplomové práce a celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a příteli za veškerou podporu během mého studia.

Obsah

1	ÚVOD	3
2	CÍL PRÁCE.....	5
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	6
3.1	Botanický popis	6
3.1.1	Čeleď Amaryllidaceae	6
3.1.2	Rod <i>Nerine</i>	6
3.1.3	<i>Nerine bowdenii</i> a její taxonomické zařazení	7
3.2	Obsahové látky	8
3.2.1	Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae	8
3.2.2	Alkaloidy rodu <i>Nerine</i>	19
3.3	Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů.....	23
3.3.1	Anticholinergní aktivita.....	23
3.3.2	Protinádorová aktivita	29
3.3.3	Antiplasmodiální aktivita	32
3.3.4	Antivirová aktivita.....	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	Všeobecné postupy	34
4.1.1	Destilace a odpařování	34
4.1.2	Sloupcová chromatografie.....	34
4.1.3	Tenkvrstvá chromatografie.....	34
4.2	Materiál a vybavení	34
4.2.1	Rozpouštědla	34
4.2.2	Chemikálie.....	35
4.2.3	Chemikálie a materiál použité ke stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	35
4.2.4	Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity.....	35
4.2.5	Chemikálie a materiál použité pro stanovení antioxidační aktivity.....	35
4.2.6	Přístroj použitý pro stanovení antioxidační aktivity	36
4.2.7	Detekční činidla.....	36
4.2.8	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografií.....	36
4.2.9	Chromatografické adsorbenty.....	36
4.3	Izolace.....	36
4.3.1	Biologický materiál	36

4.3.2	Příprava alkaloidního extraktu.....	37
4.3.3	Sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu <i>Nerine bowdenii</i>	37
4.3.4	Zpracování frakce 93-96.....	42
4.3.5	Zpracování frakcí 33 a 34.....	42
4.4	Určení struktury izolovaných látek.....	43
4.4.1	EI-MS analýza	43
4.4.2	NMR analýza.....	44
4.5	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE	44
4.5.1	Podmínky měření.....	44
4.5.2	Příprava erytrocytárních pouzder	44
4.5.3	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀).....	45
4.6	Stanovení antioxidační aktivity čistých alkaloidů	45
4.7	Stanovení cytotoxické aktivity izolovaných alkaloidů	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	Strukturní analýza ambellinu.....	47
5.1.1	MS studie ambellinu.....	47
5.1.2	NMR studie ambellinu	47
5.2	Strukturní analýza undulatinu.....	49
5.2.1	MS studie undulatinu.....	49
5.2.2	NMR studie undulatinu	49
5.3	Inhibiční aktivita vůči HuAChE a HuBuChE.....	50
5.4	Antioxidační aktivita	51
5.5	Cytotoxická aktivita.....	51
6	DISKUSE A ZÁVĚR.....	52
7	LITERATURA.....	55
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	62

1 ÚVOD

Potenciál rostlinných metabolitů je historicky známou a potvrzenou skutečností. Dokonce dnes v postgenomové době, v době proteomiky a kombinatorní chemie se rozrůstá zájem o tento zdroj nových biologicky aktivních „malých“ molekul. Uvádí se, že za posledních 20 let 61 % nových chemických entit pochází z přírodních produktů, nebo jejich příprava byla přírodními produkty inspirována. Stále však ještě zůstává větší část primárních zdrojů organických molekul chemicky nepopsána. Podíl druhů rostlin nedostatečně fytochemicky popsanych dosahuje až 75 % a znalosti o biologické aktivitě jejich nejjednodušší lékové formy jsou jen o něco málo rozsáhlejší díky tradiční medicíně. Nicméně chybí jejich zhodnocení podle současných vědeckých kritérií.¹

Rostliny čeledi Amaryllidaceae tvoří rodinu cibulovin, která obsahuje známé okrasné druhy, jako jsou rody *Amaryllis*, *Narcissus* nebo *Galanthus*. Rostliny této čeledi nacházely využití jako součást tradičních léčebných postupů původních obyvatel jižní Afriky, Latinské Ameriky a Číny. Využívaly se zejména odvary z cibulí k léčbě kašle a nachlazení. Přinášely úlevu při ledvinových a jaterních potížích a bolestech zad. V neposlední řadě byly využívány v léčbě neplodnosti.²

Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae představují zajímavou skupinu přírodních látek vyznačující se rozmanitostí svých vlastností a struktur. Z rostlin této čeledi bylo do dnešní doby izolováno a strukturně popsáno přes 500 různých alkaloidů, které jsou rozděleny do několika strukturních typů, z nichž 9 je hlavních. V současné době jsou tyto látky známé především pro klinické použití galanthaminu jako inhibitoru enzymu acetylcholinesterázy (AChE) v symptomatické léčbě Alzheimerovy choroby (AD), což je závažné neurodegenerativní onemocnění, které se klinicky projevuje jako demence. AD je nejen nejčastěji se vyskytující demence, ale také jedna z nejčastějších primárních příčin smrti.^{2,3}

Demence je jedním z nejvýznamnějších zdravotních problémů spojených se stárnutím populace. Pouze zanedbatelná část demencí je v současné době kauzálně léčitelná. Terapie ve většině případů spočívá v symptomatické a nemoc modifikující léčbě s cílem zlepšení kognitivních a nekognitivních funkcí. Základem současné farmakoterapie AD jsou léčiva, jejichž

cílem je zvýšení úrovně acetylcholinu (ACh) v mozku. Zlepšení cholinergního přenosu je dosaženo prostřednictvím inhibice AChE. V časných stádiích AD může podávání centrálně působících inhibitorů AChE u některých pacientů přechodně zlepšit kognitivní funkce a zpomalit zhoršování stavu. Vhodnými léčivy jsou donepezil, galanthamin a rivastigmin, které je třeba podávat v pozvolně se zvyšujících dávkách. Klinické studie potvrdily jejich efekt u lehkých a středně těžkých demencí. Příznivě ovlivňují jak kognitivní, tak i behaviorální příznaky nemoci. Účinek inhibitorů acetylcholinesterázy byl prokázán také u těžších fází AD. V roce 2004 Food and Drug Administration (FDA) schválila pro léčbu středně těžkého a těžkého stádia AD memantin. Memantin je antagonist N-metyl-D-aspartátových (NMDA) ionotropních glutamatergních receptorů. Má příznivý vliv na průběh a oddálení terminálních stádií nemoci a lze jej také efektivně kombinovat s inhibitory AChE.^{4,5} V mozku pacientů s AD jsou postiženy všechny oddíly cholinergního systému. Nacházíme snížení celkového množství neuromediátoru ACh, deficit cholinacetyltransferázy, tj. enzymu, který je zodpovědný za syntézu ACh, a také AChE, enzymu, který ACh odbourává. Zajímavé je, že hladina dalšího enzymu odbourávajícího ACh butyrylcholinesterázy (BuChE) při AD progresivně a významně stoupá. Strukturní rozdíly těchto dvou cholinesteráz určují rozdíly v jejich substrátové specifitě. AChE je vysoce selektivní pro hydrolýzu ACh, zatímco BuChE je schopna metabolizovat několik různých molekul včetně různých neuroaktivních peptidů. Donepezil a galanthamin vykazují relativní selektivitu vůči AChE, zatímco rivastigmin koinhibuje jak AChE tak BuChE, je tedy duálním inhibitorem.⁶

2 CÍL PRÁCE

Náplní této diplomové práce bylo zpracování alkaloidního extraktu z rostliny *Nerine bowdenii* pomocí sloupcové chromatografie. Následně pak zpracování přidělené frakce za účelem izolace dvou alkaloidů v čisté formě metodou tenkovrstvé chromatografie a stanovení jejich základních fyzikálně-chemických charakteristik.

Další součástí bylo připravit vzorky pro stanovení biologických aktivit izolovaných látek (inhibiční aktivita enzymu acetylcholinesterázy, butyrylcholinesterázy a antioxidační aktivita) a podílet se na stanovení těchto aktivit. V rámci spolupráce s Katedrou biologických a biochemických věd, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice, byla testována i cytotoxická aktivita izolovaných alkaloidů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Botanický popis

3.1.1 Čeleď Amaryllidaceae

Čeleď Amaryllidaceae (amarylkovité) představuje rodinu vytrvalých rostlin patřící do řádu Aspargales (chřestotvaré). Čeleď zahrnuje 70 rodů a nejméně 1100 druhů vyskytujících se převážně v tropických a subtropických oblastech světa. Příslušníci této čeledi mají buďto cibuli, nebo podzemní stonek. Listy jsou řemenité nebo oštěpovité a jsou seskupené na spodní části stonku, nebo uspořádány střídavě podél stonku. Květy se skládají obvykle ze tří okvětních a tří kališních lístků. Plody jsou tobolky a mají masité nebo bobulovité oplodí.

Mnoho druhů se pěstuje jako zahradní okrasné rostliny nebo rostliny pokojové. Zejména se jedná o rody *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Clivia* a *Narcissus*.⁷

3.1.2 Rod *Nerine*

Rod *Nerine*, člen čeledi Amaryllidaceae, je jedním ze 7 zástupců podkmene Amaryllidinae a čítá asi 30 druhů. Jedná se o druhý největší rod v rámci Amaryllidaceae. Vyskytuje se převážně na jihu Afriky, konkrétně v Namibii, Botswaně, Lesothu, Svazijsku a v Jihoafrické republice.⁸ Má své působiště v travnatých savanách v oblastech s četnými letními srážkami především na vlhkých skalách vyšších poloh. Hojně se vyskytuje i podél cest.⁸ Velmi málo druhů je pěstováno globálně, avšak druhy *Nerine bowdenii*, *Nerine sarniensis* a *Nerine flexuosa* jsou zajímavé druhy pěstované převážně pro komerční účely. Většina druhů rodu *Nerine* se pěstuje pro své elegantní květy jako okrasná rostlina.⁹

Většina druhů rodu *Nerine* vyžaduje velmi slunné podnebí. Druhy horských lokalit, jako jsou například *N. bowdenii*, *N. humilis* a *N. sarniensis*, dávají přednost lokalitám s ranním sluncem a odpoledním stínem. Naproti tomu druhy rostoucí na loukách a pastvinách, jako např. *N. filifolia*, *N. krigei*, a druhy obývající vyprahlé lokality, jako *N. huttoniae* a *N. laticoma*, se daří v plném slunci po celý den, nebo alespoň po většinu dne. Čtyři zimní druhy *N. humilis*,

N. pudica, *N. ridleyi* a *N. sarniensis* rostou špatně ve velmi vlhkém podnebí, zatímco většina ostatních druhů může být úspěšně pěstována ve vlhkých oblastech.⁹

3.1.3 *Nerine bowdenii* a její taxonomické zařazení

Nerine bowdenii je původem z letních pěstelských oblastí východní provincie Cape, Free state a KwaZulu-Natal. Je to vytrvalá bylina s podzemní cibulkou. Dosahuje výšky 30-70 cm, listy má úzce řemenité a až 30 cm dlouhé. Květy jsou uspořádány do okolíku na přímém stvolu a jsou nálevkovitého tvaru. Okvětní lístky mají růžovou barvu, jsou 4-5 cm dlouhé, na okraji zvlněné a nazpět stočené. V jižní Africe kvete od února do května, na severní polokouli pak v podzimních měsících. Je to jediný spolehlivě mrazuvzdorný člen rodu a přirozeně se vyskytuje na strmých jižních svazích.^{9, 10, 11}



Obrázek 1: *Nerine bowdenii*¹²

3.1.3.1 Taxonomické zařazení

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	jednoděložné (<i>Liliopsida</i>)
Řád:	chřestotvaré (<i>Asparagales</i>)
Čeleď:	amarylkovité (<i>Amaryllidaceae</i>)
Rod:	<i>Nerine</i>

3.2 Obsahové látky

3.2.1 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

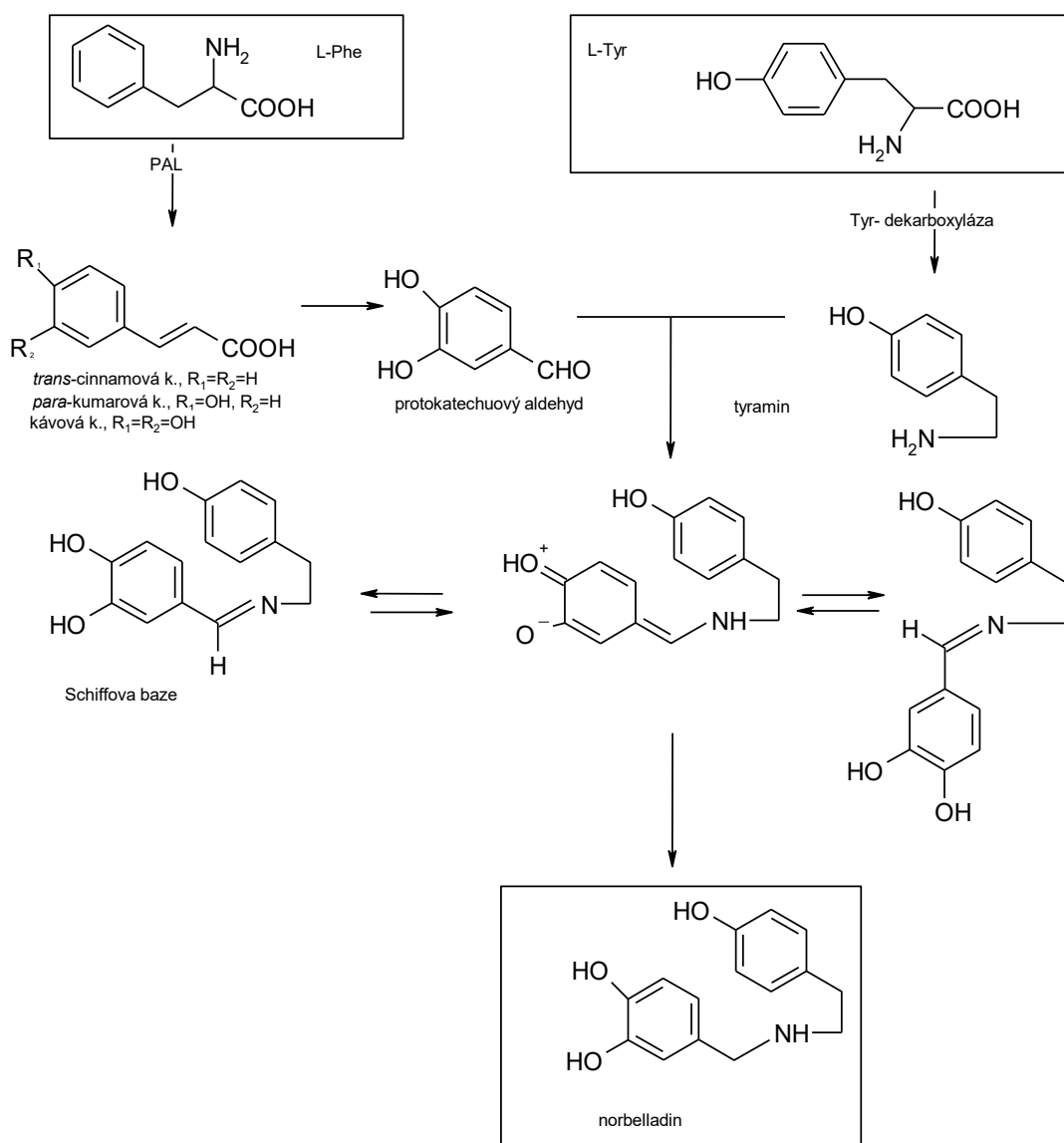
Amarylkovité alkaloidy představují širokou a stále se rozrůstající skupinu alkaloidů. Většina z nich se nevyskytuje v žádné jiné rostlinné čeledi. První izolovaný amarylkovitý alkaloid byl lykorin získaný z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* v roce 1877. Z rostlin čeledi Amaryllidaceae bylo již izolováno přes 500 alkaloidů. Společným znakem alkaloidů této čeledi je typicky tetracyklické uspořádání s pěti- nebo šestičlenným kruhem obsahujícím atom dusíku. Některé mají ještě další kruh tvořený (-O-CH₂-O-) můstkem. Toto velké množství strukturně odlišných amarylkovitých alkaloidů je klasifikováno podle svých strukturních vlastností do 9 hlavních skupin, které jsou reprezentovány norbelladinem, lykorinem, homolykorinem, krininem, haemanthaminem, narciklasinem, tazzetinem, montaninem a galanthaminem. V rámci studií bylo zjištěno, že společným prekurzorem těchto hlavních skupin je 15-ti uhlíkatá struktura norbelladinu, který je odvozen od aminokyseliny tyrosinu a fenylalaninu.^{8, 13, 14}

3.2.1.1 Biosyntéza amarylkovitých alkaloidů

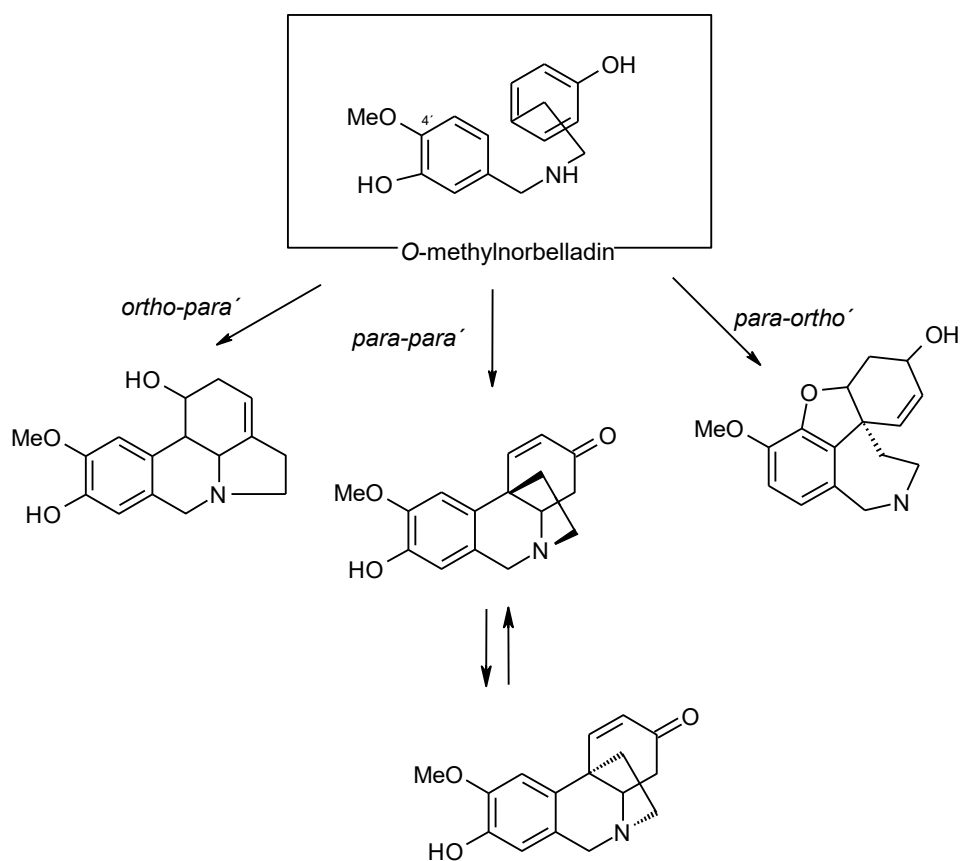
Specifickou biosyntetickou cestou amarylkovitých alkaloidů je tzv. norbelladinová cesta, která vychází z L-fenylalaninu (L-phe) a L-tyrosinu (L-tyr). Ačkoli jsou L-phe a L-tyr svou strukturou úzce příbuzné, nejsou v rostlinách zaměnitelné. V amarylkovitých alkaloidech slouží L-phe jako primární prekurzor fragmentu C₆-C₁, odpovídající kruhu A a benzylové skupině na C-6. L-tyr je prekurzorem kruhu C, dvouuhlíkatého řetězce C₁₁-C₁₂ a dusíku na C₆-C₂.¹⁵

L-tyr se mění na tyramin a L-phe na 3,4-dihydroxybenzaldehyd (protokatechuový aldehyd). Z tyraminu a 3,4-dihydroxybenzaldehydu po několika reakčních stupních vzniká 4'-O-methylnorbelladin. Tyramin a protokatechuový aldehyd, nebo jeho deriváty, jsou logickými komponentami pro biosyntézu prekurzoru norbelladinu. Tato stejné reakce představuje vstup primárních metabolitů do sekundárních metabolických drah. Reakce aminu s aldehydem má za následek vznik Schiffovy baze. Výskyt Schiffových bází v přírodě, stejně tak jako jejich snadná konverze do různých systémů Amaryllidaceae alkaloidů, ukazuje, že původní hypotézy o této biosyntetické dráze byly správné.^{13, 16}

Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení 4'-*O*-methylnorbelladinu vzniká sedm základních skeletů, které jsou pojmenovány podle svého hlavního reprezentanta. Jmenovitě se jedná o lykorinový, homolykorinový, haemanthaminový, narciklasinový, tazettinový a galanthaminový typ. Biosyntetická cesta vedoucí k montaninovému strukturnímu typu nebyla doposud spolehlivě objasněna. K hlavním typům je také řazen belladinový typ, ze kterého vychází vlastní biosyntéza amarylkovitých alkaloidů.¹⁵



Obrázek 2: Biosyntéza norbelladinu



skupina

lykorinu

homolykorinu

skupina

krininu

haemanthaminu

tazettinu

narciklasinu

skupina

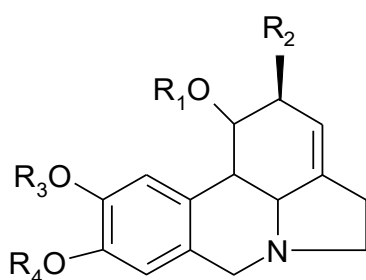
galanthaminu

Obrázek 3: Hlavní strukturní typy amarylkovitých alkaloidů

3.2.1.2 Klasifikace amarylkovitých alkaloidů

3.2.1.2.1 Alkaloidy lykorinového typu

Alkaloidy této skupiny jsou deriváty pyrrolo[de]fenanthridinu a vznikají *ortho-para* fenol oxidativním spojením. Hlavním zástupcem této skupiny je lykorin. Jedná se o pyrrollofenanthridinový cyklický alkaloid, jehož strukturu poprvé detailně popsal Nagakawa v roce 1956. Mezi další alkaloidy této skupiny patří například 1-*O*-acetyllykorin, pseudolykorin, galanthin, pluviin, norpluviin, assoanin a další.^{13, 15, 17}



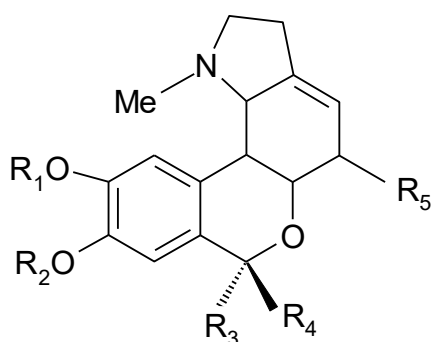
Tabulka 1: Přehled alkaloidů lykorinového typu

Alkaloid	Struktura			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
lykorin	H	OH		-CH ₂ -
1- <i>O</i> -acetyllykorin	Ac	OH		-CH ₂ -
pseudolykorin	H	OH	H	Me
galantin	H	OMe	Me	Me
pluviin	H	H	Me	Me
norpluviin	H	H	Me	H

3.2.1.2.2 Alkaloidy homolykorinového typu

Jsou odvozeny od 2-benzopyrano-[3,4-*g*]indolu. Většina alkaloidů homolykorinového typu obsahuje laktonový kruh, který tvoří kruh B. Laktonový kruh vzniká díky oxidaci hydroxylaminové skupiny na C-6. Mezi alkaloidy této skupiny řadíme například lykorenin,

8-*O*-demethylhomolykorin, hippeastrin a masonin. Hlavní alkaloid této skupiny představuje homolykorin.^{15, 17}

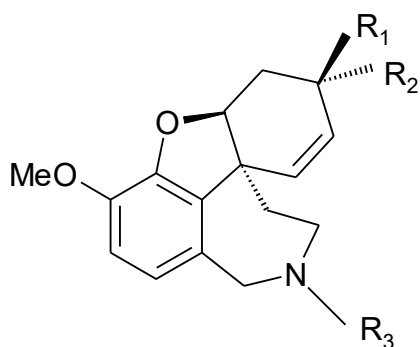


Tabulka 2: Přehled alkaloidů homolykorinového typu

Alkaloid	Struktura				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
homolykorin	Me	Me	O		H
8- <i>O</i> -demethylhomolykorin	Me	H	O		H
hippeastrin	CH ₂		O		OH
masonin	CH ₂		O		H
lykorenin	Me	Me	OH	H	H

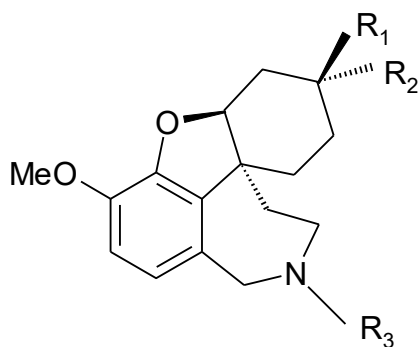
3.2.1.2.3 Alkaloidy galanthaminového typu

Alkaloidy tohoto typu jsou charakterizovány dibenzofuranovým jádrem a přítomností dvou hydroxylových skupin na aromatickém kruhu. Galanthamin byl poprvé izolován z rostliny *Galanthus woronowii* v roce 1952.¹⁸ Mezi další zástupce této skupiny patří epigalanthamin, *O*-acetylgalanthamin, norgalanthamin, epinorgalanthamin, narcisin a narwedín. Z dalších pak například lykoramin, norlykoramin a epinorlykoramin, které se liší absencí dvojnás vazby na C-9.^{13, 17}



Tabulka 3: Přehled alkaloidů galanthaminového typu I.

Alkaloid	Struktura		
	R ₁	R ₂	R ₃
galanthamin	OH	H	Me
O-acetylgalanthamin	OAc	H	Me
norgalanthamin	OH	H	H
epinorgalanthamin	H	OH	H
narcisin	OH	H	Ac
narwedín		O	Me

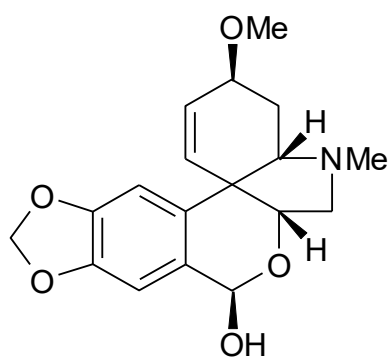


Tabulka 4: Přehled alkaloidů galanthaminového typu II.

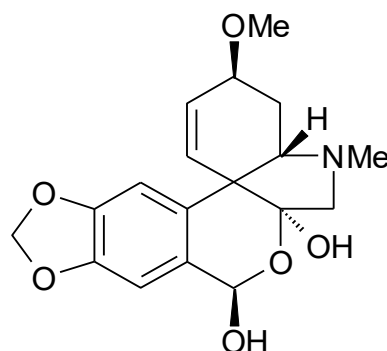
Alkaloid	Struktura		
	R ₁	R ₂	R ₃
lykoramin	OH	H	Me
norlykoramin	OH	H	H
epinorlykoramin	H	OH	H

3.2.1.2.4 Alkaloidy tazettinového typu

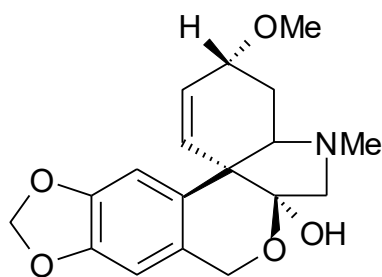
Tato skupina zahrnuje alkaloidy strukturně odvozené od 2-benzopyrano[3,4-*c*]indolu. Hlavním představitelem této skupiny je tazettin. Tento alkaloid byl izolován z rostliny *Narcissus tazetta* a poprvé podrobněji zkoumán Späthem a Kahovcem v roce 1934, kteří objasnili jeho dílčí struktury. Tazettin je považován za jeden z nejčastěji se vyskytujících alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Bylo prokázáno, že tazettin není přirozeně se vyskytující alkaloid ale spíše jen artefakt odvozený z chemicky labilního prekursoru pretazettinu.^{13, 19, 20}



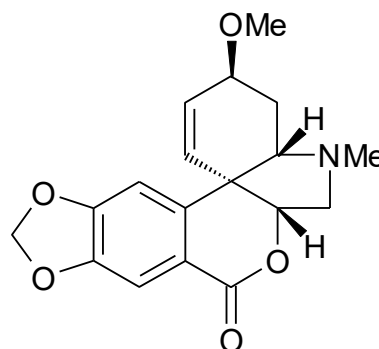
pretazettin



tazettin



kriwellin

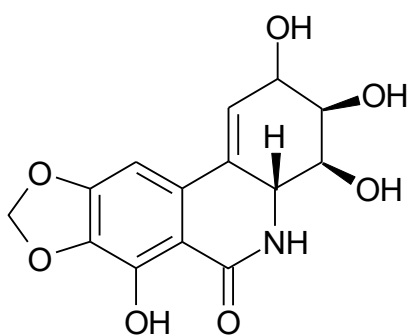


3-epimakronin

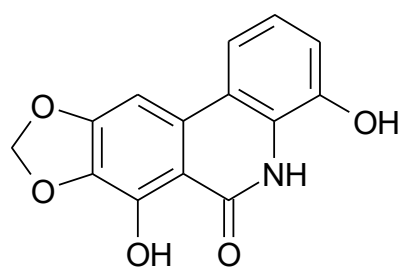
Obrázek 4: Struktury vybraných alkaloidů tazettinového typu

3.2.1.2.5 Alkaloidy narciklasinového typu

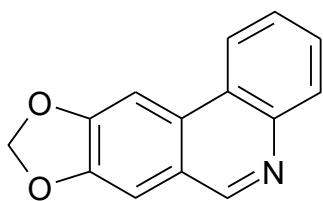
Narciklasinové alkaloidy jsou odvozeny od fenanthridinu. Narciklasin je hlavním zástupcem této skupiny. Jeho schopnosti regulace růstu u rostlin byly využity při zkoumání jeho působení proti živočišným nádorovým liniím. Do této skupiny se dále řadí například narciprimin, trisphaeridin, bikolorin, pankratistatin a ismin.¹⁷



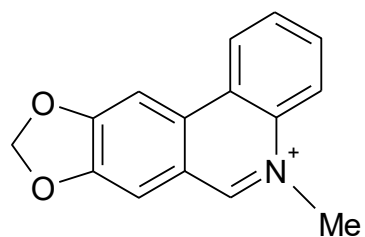
narciklasin



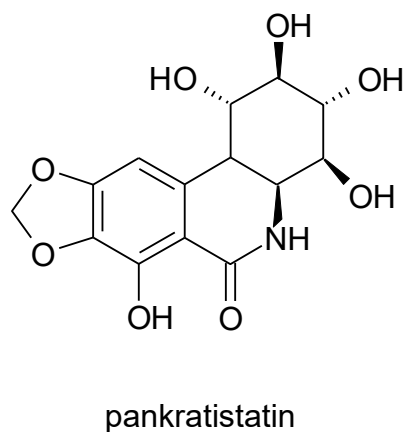
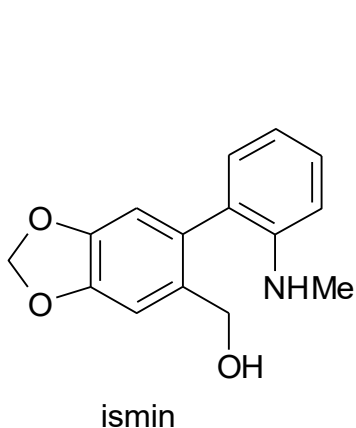
narciprimin



trisphaeridin



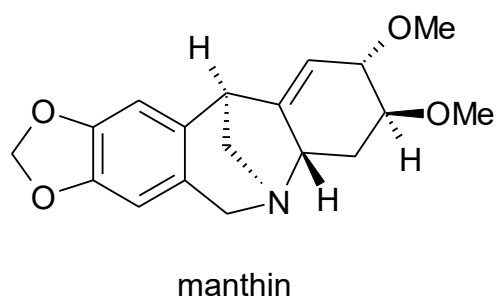
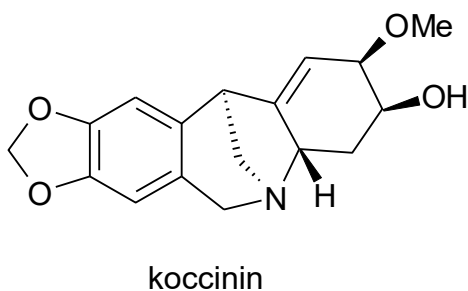
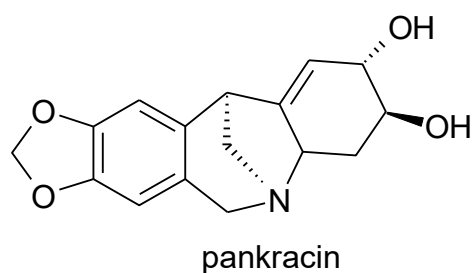
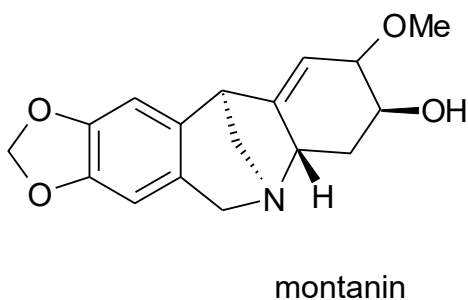
bikolorin

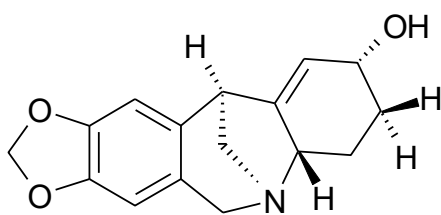


Obrázek 5: Struktury vybraných alkaloidů narciklasinového typu

3.2.1.2.6 Alkaloidy montaninového typu

Mezi alkaloidy montaninového typu řadíme především montanin, pankracin, koccinin, manthin a brunsvigin.²¹ Mají strukturu odvozenou od 5,11-methanomorphanthridinu a liší se pouze konfigurací na C-2 a C-3. Tento druh alkaloidů je obtížně dostupný z přírodních zdrojů, neboť je obsažen ve velmi malém množství. Jejich slibné biologické aktivity jsou důvodem hledání co nejefektivnějších metod jejich syntézy.²²



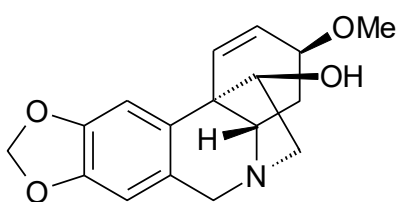


brunsvigin

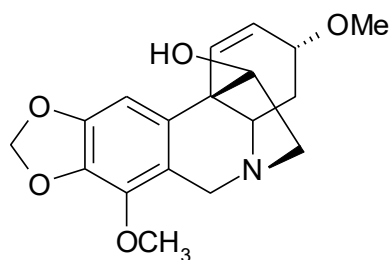
Obrázek 6: Struktury vybraných alkaloidů montaninového typu

3.2.1.2.7 Alkaloidy krininového a haemanthaminového typu

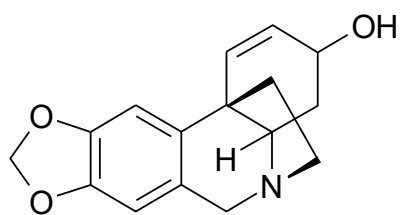
Alkaloidy kininového typu jsou strukturně odvozené od molekuly 5,10b-ethanophenanthridinu. Do této skupiny řadíme kromě krininu také krinamin, haemanthamin, haemanthidin, ambellin a další. Haemanthamin je hned po lykorinu druhým nejhojnějším alkaloidem vyskytujícím se v rostlinách čeledi Amaryllidaceae. Vyskytuje se převážně v cibulích rodu *Haemanthus* a *Narcissus*.^{13, 14, 23} Tento alkaloid má pro svou významnou antiproliferativní aktivitu veliký potenciál k využití při léčbě nádorových onemocnění. Dalšími příbuznými alkaloidy haemanthaminu jsou například ambellin, 6 α -hydroxybuphanisin a 6 β -hydroxybuphanisin.^{17, 24} Krinin je alkaloid vyskytující se hlavně u rodů *Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Narcissus*, *Nerine* a *Hymenocalis*.²⁵ Je významný pro svou antimalarickou aktivitu, která je pravděpodobně připisována přítomnosti methylenedioxylové skupiny vázané na aromatickém jádře.²⁶ Alkaloidy této strukturní skupiny byly testovány na cytotoxickou aktivitu vůči gliovým buňkám resistantním k apoptóze a projevíly též silnou antiproliferativní aktivitu; jmenovitě alkaloidy bulbispermin, haemanthamin a haemanthidin.²⁷



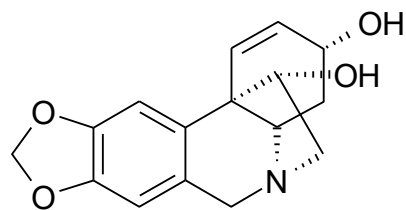
haemanthamin



ambellin

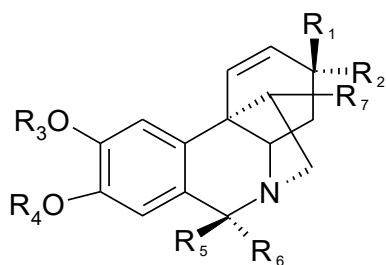


krinin



bulbispermin

Obrázek 7: Struktury vybraných alkaloidů krininového typu



Tabulka 5: Přehled dalších alkaloidů krininového typu

Alkaloid	Struktura						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
maritidin	OH	H	Me	Me	H	H	H
vittatin	OH	H	CH ₂		H	H	H
papyramin	OMe	H	Me	Me	H	OH	H
haemanthidin	OMe	H	CH ₂		H	H	OH
krinamin	H	OMe	CH ₂		H	H	OH
narcein	OMe	H	Me	H	H	H	OH

3.2.2 Alkaloidy rodu *Nerine*

3.2.2.1 *Nerine bowdenii*

Cibule rostlin tohoto druhu obsahují především ambellin, krinamidin, lykorin a undulatin. Ambellin je haemanthaminový alkaloid hojně se vyskytující v rostlině *Amaryllis belladonna* a v mnoha dalších druzích čeledi Amaryllidaceae. Byla pozorována jeho cytotoxická aktivita *in vitro* proti P-388 buňkám sarkomu, která však nebyla prokázána *in vivo*. Vykazuje mimo jiné slabý hypotenzní účinek, působí jako srdeční stimulant a podporuje účinky epinefrinu. Krinamidin neboli 1,2-epoxypowellin, je dalším alkaloidem haemanthaminového typu. Je ve vyšších koncentracích obsažen v rostlinách *Crinum powellii*, *Crinum moorei* a v několika dalších Amaryllidaceae druzích. Jeho +forma se nazývá krinalbin a vyskytuje se v rostlině *Crinum powellii*. Mezi krininové alkaloidy patří krinidin. Tento alkaloid izolovaný z rostliny *Crinum moorei* vykazoval mírnou analgetickou aktivitu u myší. Hlavním zástupcem skupiny lykorinových alkaloidů je lykorin. Vyskytuje se hojně v rodech *Lycoris*, *Urginea*, *Narcissus*, *Hymenocallis* a mnoha dalších. Tento nejrozšířenější amarylkovitý alkaloid působí jako respirační stimulant, modulátor fagocytózy, vykazuje antimalarické účinky a u rostlin se uplatňuje jako inhibitor růstu skrze inhibici syntézy proteinů. V řadě studií zabývajících se biologickou aktivitou lykorinu byla prokázána jeho antitumorová aktivita.²⁸



Obrázek 8: *Nerine bowdenii*²⁹

3.2.2.2 Alkaloidy ostatních druhů rodu *Nerine*

Tabulka 6: Přehled ostatních druhů rodu *Nerine* a jejich alkaloidů

<i>Nerine filifolia</i> ^{2, 30}	belladin N-demethylbelladin 6α-hydroxybuphanidrin 6α-methoxybuphanidrin filifolin krinin
<i>Nerine filamentosa</i> ³⁰	buphanamin lykorin undulatin ambellin acetylparkamin parkamin
<i>Nerine corusca</i> ³¹	deoxylykorenin tazettin krinamidin lykorin vittelin koruscin
<i>Nerine masoniorum</i> ³¹	karanin lykorin narcissidin masonin tazettin haemanthamin
<i>Nerine undulata</i> ^{32, 33}	ambellin buphanamin buphanidrin flexinin krinamidin bowdesin krispin nerispin nerundin lykorin undulatin

Uvádí se, že *in vitro* AChE inhibiční aktivita rostlin čeledi Amaryllidaceae je spojena zejména s alkaloidy galanthaminového a lykorinového typu, naopak alkaloidy typu haemanthaminu, homolykorinu a tazettinu tyto vlastnosti vesměs nevykazují, nebo vykazují pouze slabou inhibiční aktivitu. Například ambellin, alkaloid haemanthaminového typu vyskytující se kromě *Nerine bowdenii* také v rostlinách *N. flexuosa* a *N. undulata*, vykazoval ve

studii³⁴ publikované v r. 2013 pouze slabou inhibiční aktivitu vůči HuAChE (lidská acetylcholinesteráza). Mezi lykorinové alkaloidy vyskytující se v rostlinách rodu *Nerine* patří například karantin a falkatin. Karantin vykazuje kromě AChE inhibiční aktivity také hypotenzní účinky a antiproliferativní aktivitu vůči P-388 buňkám myši lymfocytární leukemie. Falkatin kromě inhibice AChE vykazuje také slabé analgetické, konvulzivní a hypertenzní účinky. Zajímavé výsledky z pohledu AChE inhibiční aktivity byly zjištěny u alkaloidu undulatinu, který se vyskytuje například v rostlině *Nerine undulata*.³⁴

V roce 2012 byla publikována studie³⁰, která se zabývala testováním cholinesterázové inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vybraných druhů rostlin čeledi Amaryllidaceae. Nadějnou AChE inhibiční aktivitu vykazovaly alkaloidní extrakty z rostlin *Nerine filifolia* ($IC_{50, AChE} = 18,5 \pm 0,8 \mu M$) a *Nerine filamentosa* ($IC_{50, AChE} = 21,6 \pm 1,1 \mu M$). V jejich extraktu dominují alkaloidy krininového (*N. filamentosa*) a homolykorinového typu (*N. filifolia*). Při testování inhibiční aktivity krininových alkaloidů byla zjištěna pouze slabá aktivita, což ukázalo, že stereochemie 5,10b-etano můstku nemá vliv na AChE inhibiční aktivitu. Při následném testování alkaloidů homolykorinového typu nebyla zaznamenána žádná cholinesterázová inhibiční aktivita.

Jiná studie³³ publikovaná v roce 2011 testovala mimo jiné cholinesterázovou inhibiční aktivitu alkaloidního extraktu z rostliny *Nerine undulata*. Extrakt vykazoval slabou inhibiční aktivitu proti AChE ($IC_{50, AChE} = 14,3 \pm 1,2 \mu M$) i BuChE ($IC_{50, BuChE} = 33,9 \pm 1,9 \mu M$). Již dříve bylo zjištěno že BuChE hraje důležitou úlohu v pozdních stádiích AD. V tomto případě by BuChE mohla být vhodnějším terapeutickým cílem, ale na inhibiční aktivitu vůči BuChE bylo zatím testováno pouze omezené množství alkaloidů.



Obrázek 9: *Nerine corusca*³⁵ a *Nerine falcata*³⁶



Obrázek 10: *Nerine flexuosa*³⁷ a *Nerine krigei*³⁸



Obrázek 11: *Nerine masoniorum*³⁹ a *Nerine undulata*¹⁰

3.3 Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů

Tyto látky se vyznačují širokou biologickou aktivitou, jako je protinádorová, protivirová a anticholinergní aktivita. Některé z nich byly využívány k léčbě myasthenia gravis, myopatie, nebo onemocnění nervového systému.²⁶

3.3.1 Anticholinergní aktivita

3.3.1.1 Demence a Alzheimerova choroba

Demence je heterogenní skupina onemocnění, jejíž výskyt stoupá s věkem a postihuje až 20% populace ve věku nad 65 let. Jedná se o syndrom, který vznikl následkem chronického nebo progresivního onemocnění mozku, u něhož dochází k narušení mnoha vyšších korových funkcí, jako je paměť, myšlení, orientace, chápání, uvažování, schopnosti učení, řeči a úsudku, ale vědomí není zastřeno. Porucha kognitivních funkcí je obvykle doprovázena a někdy také předcházena zhoršením kontroly emocí, sociálního chování nebo motivace.⁴⁰

Alzheimerova nemoc je nejčastější příčinou demence. Jedná se o závažné neurodegenerativní onemocnění, které představuje jednu z nejčastějších primárních příčin smrti. AD se vyznačuje tím, že již v počátcích je porušen centrální acetylcholinergní systém. Hypotézy předpokládají, že výpadky paměti u pacientů s AD jsou zapříčiněny nedostatečnou cholinergní aktivitou v mozku. Nejvýznamnější změny byly zaznamenány v hypocampální a kortikální oblasti, kde byly pozorovány snížené hladiny neurotransmiteru acetylcholinu. Kromě podstatně snížené tvorby a uvolňování acetylcholinu z presynaptických zakončení je snížena i hladina enzymu cholinacetyltransferázy (ChAT), který se podílí na syntéze ACh. Zároveň je snížen i vstup prekursoru cholinu do neuronů a využitelnost druhého prekursoru acetyl-koenzymu A. Snížen je i počet nikotinových acetylcholinergních receptorů, zatímco počet muskarinových acetylcholinergních receptorů zůstává relativně nezměněn.^{41, 42}

Jelikož se počet nemocných s AD od věku 65 let každých 5 let přibližně zdvojnásobuje, ve věku nad 85 let by tedy mělo trpět AD 20-50% populace. Mezi faktory, které mohou zvyšovat riziko řadíme věk, výskyt AD v rodinné anamnéze, ženské pohlaví, výskyt Parkinsonovy nemoci v rodinné anamnéze, výskyt Downova syndromu v rodinné anamnéze nebo nízké vzdělání.⁴³

3.3.1.2 Původ a vývoj Alzheimerovy nemoci

Existuje několik teorií o původu a vývoji AD. Kromě cholinerní a amyloidní teorie existuje například hypotéza oxidačního stresu a oxidační nerovnováhy, hypotéza o oxidu dusnatém a další. I když existují určitá omezení pro přijetí cholinerní a amyloidní teorie, jsou tyto považovány za hlavní.⁴⁴

Amyloidní teorie hovoří o patologickém proteinu A β (β -amyloidu), který je tvořen a následně ukládán vlivem poruchy metabolismu APP (amyloidní prekurzorový protein). Následně dochází k degeneraci neuronálního τ -proteinu vlivem jeho zvýšené fosforylace působením A β . To vede k narušení tvorby mikrotubulů a agregace proteinu do klubek. Změny v synapsích ovlivňují kognitivní funkce. Amyloidní plaky obsahující A β v mozkové kůře a hipokampu a následné vytvoření NFTs (n-terminální fragmenty) může být hlavním spouštěčem neurodegenerace mozku u pacientů s AD.⁴⁴

Důležitou roli zde hraje také oxidační a nitrosativní stres. Dochází k nim v průběhu onemocnění v důsledku přítomnosti A β . Má se za to, že aktivace mikroglie je zapojena do tvorby neurotických plaků a také se vylučují potenciálně neurotoxické cytokiny. Fibrily A β reagují se scavengerovými receptory a s prozánětlivými RAGEs (receptor for advanced glycan end) receptory na povrchu buněk. Tato reakce způsobí depolarizaci buněčné membrány; aktivace NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptorů a zvýšení neuronální intracelulární koncentrace Ca²⁺ způsobí sterilní zánět a zánik neuronů.⁴⁴

Cholinerní teorie předpokládá, že kognitivní porucha souvisí s deficitem cholinerní neurotransmise a s tím spojeným nedostatkem centrálních cholinerních funkcí. Tvorba a vylučování ACh je patologicky snížena.⁴⁴

3.3.1.3 Role acetylcholinu a acetylcholinesterázy

Acetylcholin je mediátor zapojený do procesu učení, paměti, pozornosti a motorických dovedností. Je syntetizován cholinerními neurony prostřednictvím ChAT a je odbouráván v synaptické šterbině enzymem AChE. U AD se na odbourávání acetylcholinu podílí také enzym BuChE, který je tvořen v oblasti β -amyloidního plaku.⁴⁴ V normálním mozku je aktivita BuChE

soustředěna zejména v oblastech glie a endoteliálních buňkách, zatímco AChE se vyskytuje v neuronech a axonech. Neurony obsahující AChE jsou hojně rozšířené a početnější, ale obzvláště v hippocampu, thalamu a amygdale nalézáme četný výskyt BuChE imunopozitivních neuronů.⁶

3.3.1.4 Farmakoterapie

Farmakoterapie demencí včetně AD může být dělena na farmakoterapii kognitivních (poznávacích funkcí) a na farmakoterapii ostatních funkcí (poruch chování, emocí, spánku, léčbu přidružených delirií apod.) Mezi kognitivní funkce patří například paměť, vnímání a pozornost. Farmakoterapie AD vychází z ovlivnění dosud známých patogenetických mechanismů. Komplexní etiologie této choroby není dosud plně objasněna, proto není zatím možná kauzální terapie.³

Látky zlepšující funkci centrálního acetylcholinergního systému se nazývají kognitiva. V klinické praxi mají největší význam inhibitory cholinesteráz. Většina z užívaných látek jsou inhibitory AChE, některé však také inhibují BuChE. Inhibitory AChE jsou jedinými schválenými léčivy k léčbě pacientů s lehkým a středním stupněm AD. Podstata terapeutického působení u AD spočívá v zablokování enzymů odbourávajících acetylcholin a tím prodloužení vazby acetylcholinu na své receptory s následným zvýšením acetylcholinergní transmise. Inhibitory cholinesteráz mají efekt především na zpomalení průběhu AD a na oddálení přechodu demence do těžších stádií.^{3, 41}

Inhibice cholinesteráz může probíhat reverzibilním způsobem, kdy inhibitor nebo jeho aktivní metabolity jsou odbourávány v játrech a jejich působení trvá po dobu jejich přítomnosti v plazmě nebo pseudoreverzibilním způsobem, kdy jsou inhibitory odbourávány přímo cholinesterázami a jejich působení trvá déle, než je jejich přítomnost nebo přítomnost jejich aktivních metabolitů v plazmě. Ireverzibilní inhibitory nejsou v léčbě AD používány pro množství nežádoucích účinků. Poměrně značně selektivním inhibitorem AChE je donepezil. Poločas odbourávání okolo 70 hodin umožňuje perorální podávání 1x denně. Rivastigmin je cholinergní dualista, který inhibuje AChE i BuChE.³

Schopnost inhibovat AChE mají i některé amarylkovité alkaloidy, což umožňuje jejich uplatnění při léčbě AD. Cibule rodu *Narcissus*, *Galanthus* a *Leucojum* jsou v popředí zájmu pro obsah galanthaminu, který se používá k léčbě AD.²⁶ Míra schopnosti alkaloidů inhibovat AChE nebo BuChE je vyjadřována hodnotou IC₅₀, která představuje koncentraci léčiva, která způsobí 50% inhibiční efekt. Obecně je IC₅₀ měřítkem účinnosti látky při inhibici specifické biologické nebo biochemické funkce.

3.3.1.4.1 Galanthamin

Galanthamin je alkaloid typu terciálního aminu, který byl izolován z cibulí kavkazské sněženky *Galanthus woronowii*.¹⁸ Je také možné ho získat z cibulí běžných sněženek a z několika dalších rodů čeledi Amaryllidaceae například *Narcissus*. Galanthamin je dlouhodobě působící, selektivní, reverzibilní a kompetitivní inhibitor AChE. Snížením odbourávání ACh prostřednictvím inhibice AChE se zvýší dostupnost ACh v synaptické štěrbině. Galanthamin se kompetitivně a reverzibilně váže na aktivní místo AChE a tím enzym inhibuje. Zvláště důležitý je inhibiční efekt v oblasti frontální kůry a hippocampální oblasti mozku, tato dvě místa jsou totiž u pacientů s AD nejvíce zasažena. Výhoda galanthaminu oproti ostatním inhibitorům AChE používaným v terapii AD spočívá v jeho schopnosti alostericky modulovat nikotinové receptory, což zvyšuje produkci ACh. Jak již bylo uvedeno výše, při AD dochází k snížení počtu cholinergních neuronů, což koreluje se zvýšeným kognitivním deficitem, jako jsou poruchy paměti nebo učení.^{18, 42, 45}

Zjistilo se, že galanthamin má až 53-krát vyšší afinitu k AChE než k BuChE. Nižší afinita galanthaminu k BuChE může být příčinou dobré snášenlivosti galanthaminu. BuChE se vyskytuje převážně v plasmě a nezjistilo se, že by hrála významnější roli v cholinergních poruchách na počátku AD, zato se však ukázalo, že inhibice tohoto enzymu může být příčinou periferních nežádoucích účinků. U AD stále probíhají dlouhodobé studie, kde je mimo jiné látka hodnocena také pro ostatní formy demence, při jejichž léčbě by se mohlo těžit právě z dvojího způsobu účinku galanthaminu- inhibice AChE a modulace nikotinových receptorů.⁴²

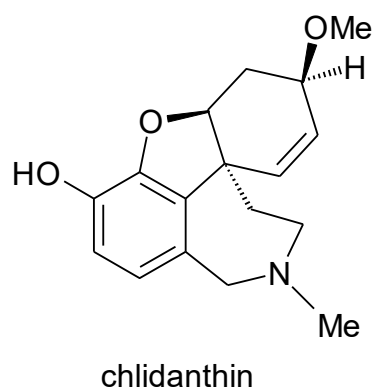
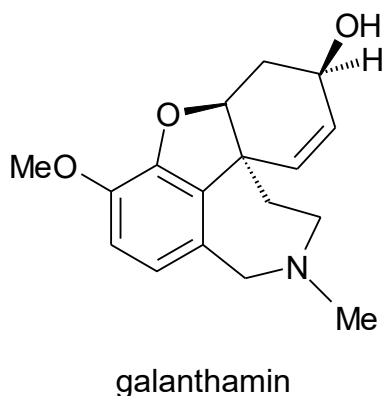
V několika klinických studiích bylo prokázáno signifikantní zlepšení kognitivních i nekognitivních symptomů AD po podání galanthaminu. Obvyklá denní terapeutická dávka pro

léčbu AD činí 24 mg. Studie ukázaly, že vyšší dávky již nezlepšují kognitivní funkce pacientů. V jedné studii byla testována účinnost galanthaminu u pacientů se slabým a středním postižením AD na základě jedenáctipoložkového testu kognitivních funkcí a dále podle sedmistupňové metodiky založené na ústních rozhovorech s pacienty a ošetřovateli. Bylo prokázáno, že ve srovnání s placebem galanthamin signifikantně zlepšil kognitivní funkce pacientů, což se pozitivně odrazilo v jejich každodenních aktivitách.¹⁸

3.3.1.4.2 Chlidanthin a ostatní alkaloidy galanthaminového typu

Látky strukturně podobné galanthaminu mohou mít podobné farmakologické vlastnosti. Přestože galanthamin je produkován mnoha rody čeledi Amaryllidaceae, jeho poziční izomer chlidanthin byl zaznamenán pouze v několika málo druzích. Chlidanthin byl poprvé izolován před více než 50 lety z rostliny *Chlidanthus fragrans* a později také z *Haemanthus multiflorus*, a jeho struktura byla odvozována hlavně chemickými metodami. Biologická aktivita chlidanthinu byla testována ve studii⁴⁶ publikované v roce 2011, kde byl chlidanthin spolu s galanthamin-*N*-oxidem a dalšími alkaloidy izolován z cibulí rostliny *Zephyranthes concolor*. Při testování anticholinergní aktivity chlidanthinu byla naměřena 4,6-krát nižší aktivita než u galanthaminu, což může být mimo jiné vysvětleno tím, že chlidanthin, na rozdíl od galanthaminu, nemá intramolekulární vodíkovou vazbu mezi hydroxylem na C-3 a kyslíkem na dihydrofuranovém jádře. Tato vazba pravděpodobně hraje důležitou roli v inhibiční acetylcholinesterázové aktivitě galanthaminu. Při studii anticholinergní aktivity galanthamin-*N*-oxidu byla zjištěna 5-krát nižší aktivita oproti galanthaminu. Vztahy mezi strukturou a účinkem této látky se však studie dopodrobna nezabývala. V další studii³⁴ publikované v r. 2013 byly naměřeny následující hodnoty cholinesterázové inhibiční aktivity chlidanthinu izolovaného z rostliny *Chlidanthus fragrans*; $IC_{50, HuAChE} = 147 \pm 6$, $IC_{50, HuBuChE} = 422 \pm 15$.³⁴

Nízká inhibiční aktivita lykoraminu a epinorlykoraminu je vysvětlována přítomností dvojné vazby na kruhu C, která neumožňuje stejné prostorové uspořádání, jako mají ostatní aktivní látky této třídy.⁴⁶



3.3.1.4.3 Alkaloidy lykorinového typu

Uvádí se, že kromě alkaloidů galanthaminového typu je cholinesterázová inhibiční aktivita amarylkovitých alkaloidů spojována také s alkaloidy lykorinového typu (s výjimkou samotného lykorinu).³⁴ Alkaloidy lykorinového typu jsou z hlediska inhibice AChE méně účinné než alkaloidy galanthaminového typu. Bylo zjištěno, že cholinesterázová inhibiční aktivita lykorinových alkaloidů je spojena se substitucí na C-1 a C-2.⁴¹ Ve studii⁴⁷ z roku 2013 byla pozorována pozoruhodná biologická aktivita 1,2-di-*O*-acetyllykorinu a 1-*O*-acetyllykorinu izolovaných z rostliny *Lycoris radiata*. Tyto látky silně inhibovaly toxicitu Aβ (beta amyloid). Útlum toxicity Aβ z velké části vychází ze schopnosti těchto alkaloidů inhibovat genovou expresi acetylcholinesterázy.

Ve studii⁴¹ z roku 2002, která se zabývala testováním cholinesterázové inhibiční aktivity 23 amarylkovitých alkaloidů, vykazoval v rámci lykorinových alkaloidů nejlepší výsledky assoanin, i když jeho hodnota IC₅₀ byla 4-krát nižší než hodnota galanthaminu. Vyšší hodnota assoaninu a oxoassoaninu, s ohledem na ostatní alkaloidy, může být vysvětlena přítomností aromatického kruhu C, který dává molekule planaritu.

3.3.1.4.4 Alkaloidy kininového a haemanthaminového typu

V již zmíněné studii publikované v roce 2013, která se zabývala testováním inhibiční aktivity 11 amarylkovitých alkaloidů na HuAChE (lidská acetylcholinesteráza), HuBuChE (lidská butyrylcholinesteráza) a POP (prolyloligopeptidáza), byla naměřena inhibiční aktivita undulatinu IC_{50, HuAChE} = 23 ± 1 μM, což je více než 11-ti násobně nižší aktivita než vykazoval standard galanthamin³⁴

3.3.1.4.5 Inhibice prolyloligopeptidázy

Zajímavým terapeutickým cílem a pomocnou léčbou u pacientů s AD může být inhibice POP. Jedná se o cytosolovou serinovou peptidázu, která štěpí malé peptidy obsahující aminokyselinu prolin. Štěpení probíhá na karboxy-konci prolinových zbytků. Substráty tohoto enzymu jsou například substance P, vazopresin či některé neuropeptidy. Právě ty jsou známy svou funkcí modulátorů kognitivních funkcí a jejich degradace POP může urychlovat proces stárnutí a případně hrát roli při neurodegenerativních onemocněních.⁴⁸

V posledních letech POP přitahuje pozornost jako možnost při terapii schizofrenie, bipolární afektivní poruchy či kognitivních poruch. Právě ty se vyskytují u pacientů trpících AD. Některé inhibitory POP se ukázaly efektivními léčivy demencí⁴⁹, a tudíž by mohla být inhibice POP také podpůrnou léčbou pacientů s AD.

3.3.2 Protinádorová aktivita

K dalším významným účinkům alkaloidů čeledi Amaryllidaceae patří jejich protinádorová aktivita indukci apoptózy. Výraznou výhodou je také jejich vysoká selektivita pro nádorové buňky a relativně nízká toxicita k zástupcům buněk zdravých nebo buněk klidových.¹⁵

3.3.2.1 Lykorin

Alkaloidy spadající do lykorinového strukturního typu patří mezi nejznámější a pravděpodobně i nejúčinnější z pohledu cytotoxicity. Lykorin, alkaloid izolovaný z různých druhů rostlin čeledi Amaryllidaceae, přitahuje značnou pozornost z důvodu své slibné biologické aktivity. Jeho protinádorové vlastnosti byly vyhodnocovány *in vitro* a *in vivo* na různých preklinických modelech lidských nádorů. Bylo testováno 22 sloučenin příbuzných lykorinu pro *in vitro* protinádorovou aktivitu pomocí 4 nádorových buněčných linií, které vykazují různé stupně odolnosti na pro-apoptotické podněty. Ukázalo se, že z testovaných látek vykazoval lykorin nejvyšší antitumorovou aktivitu, a dále bylo prokázáno, že je až patnáctkrát více aktivní proti rakovinnému bujení než proti normálním buňkám. Tyto slibné biologické výsledky vedly k výzkumu vztahů mezi strukturou a aktivitou, přes izolaci přírodních kongenerů lykorinu a syntézu jeho analogů.^{15, 50, 51}

Ukázalo se, že lykorin uplatňuje svou *in vitro* protinádorovou aktivitu spíše prostřednictvím svých cytostatických účinků, než prostřednictvím účinků cytotoxických.^{45, 46} V terapeutických koncentracích lykorin v rakovinných buňkách neindukuje apoptózu, ale vykazuje cytostatické účinky ovlivněním aktinu v buněčném cytoskeletu. Tento mechanismus účinku odpovídá za jeho slibnou aktivitu *in vitro* proti panelu linií nádorových buněk odolných proti pro-apoptotickým podnětům a také *in vivo* v modelu myšího melanomu. Data ukazují, že lykorin vykazuje výraznou inhibiční aktivitu proti růstu všech nádorových buněčných linií bez ohledu na to, zda jsou rakovinné buňky citlivé nebo rezistentní na pro-apoptotické podněty. Nicméně aktivita byla významně ovlivněna strukturálními úpravami v rámci fenanthridinového skeletu.^{50, 51}

Protinádorová aktivita lykorinu byla prokázána *in vivo* u myšího melanomu BL6 a Lewisova plicního karcinomu, a také *in vitro* na HeLa buňkách a mnoha dalších typech nádorových buněk, jako jsou CEM, K562, MCF-7, G-361 a BJ.⁵²

3.3.2.2 *Haemanthaminový a krinanový typ*

Mezi vůbec nejúčinnější alkaloidy této skupiny patří krinin. Ze studie 8 přírodních a 2 syntetických alkaloidů krinanového typu vyplývá schopnost pouze krinaminu a haemanthaminu selektivně iniciovat apoptózu u nádorových buněk potkaního hepatocelárního karcinomu 5123tc, a zároveň nepůsobit cytotoxicky vůči linii lidských embryonálních buněk ledvin HEK 293T ve stejných koncentracích.¹⁵

Haemanthamin a haemanthidin působí cytotoxicky na nádorové buňky. Antiproliferativní účinek haemanthaminu, haemanthidinu a jejich syntetických derivátů nezávisí na citlivosti nádorových buněčných linií k apoptóze. Naopak se ukazují srovnatelné potence u obou typů buněk, což naznačuje, že indukce apoptózy není v této sérii sloučenin primárním mechanismem odpovědným za antiproliferativní aktivitu.²⁷

Mechanismus apoptotického účinku těchto alkaloidů byl zatím prostudován pouze minimálně. Haemanthamin pravděpodobně inhibuje proteosyntézu tím, že blokuje vznik peptidové vazby v kroku, kdy se peptidil-transferáza váže na 60S podjednotku ribozomu. Později byla prokázána inhibice růstu buněk myšího lymfomu L 5178 prostřednictvím tvorby komplexu

haemanthaminu s RNA. Protinádorová aktivita haemanthaminu a haemanthidinu je také spojována s přítomností ethoxyskupiny v α poloze na C-11. Jejich protějšky jako např. buphanamin, buphanisin a ambellin, které mají na C-11 ethoxyskupinu v poloze β tyto antiproliferativní vlastnosti nevykazují.^{15, 27}

3.3.2.3 Narciklasinový typ

Alkaloidy tohoto typu jsou odvozeny od molekuly fenanthridinu. Zatím nejlepší výsledky z pohledu cytotoxicity vykazují narciklasin a pankratistatin. Pankratistatin je přírodní alkaloid, který byl poprvé izolován z cibulí hawajské lilie *Hymenocallis littoralis* v roce 1993.^{15, 53} Tento alkaloid je významný především pro svou schopnost indukovat cytotoxicitu v řadě nádorových buněčných linií při koncentracích nižších než 1 μ M s minimálním vlivem na zdravé buňky. Jeho antineoplastické vlastnosti se prokázaly u mnoha typů malignit, jako např. rakovina prsu, tlustého střeva, ledvin, leukemie, rakoviny prostaty, melanomu, osteosarkomu a dalších.⁵⁴ Jeho výjimečnost spočívá v tom, že na rozdíl od klasických genotoxických chemoterapeutik, která způsobují spontánní apoptózu buněk pomocí extrémního zasažení DNA a mechanismu oprav, pankratistatin zasahuje mitochondrie, které hrají centrální úlohu v navození apoptózy.^{55, 56} Bylo zjištěno, že v nádorových buňkách vystavených pankratistatinu došlo k výraznému zvýšení reaktivních forem kyslíku (ROS), což se následně projevilo mitochondriální disfunkcí v podobě náhlého snížení ATP v buňkách nádorových linií léčených pankratistatinem. V normálních zdravých buňkách tyto jevy nebyly pozorovány.⁵⁶ Z toho vyplývá, že pankratistatin specificky indukuje apoptózu v rakovinných buňkách bez minimálních toxických účinků na normální buňky.

Narciklasin je alkaloid odvozený od molekuly fenanthridinu, poprvé izolovaný z cibulí rodu *Narcissus* v roce 1967.¹⁵ Byla zjištěna jeho silná antimitotická aktivita zprostředkovaná vazbou na 60S podjednotku ribozomu, čímž inhibuje enzym peptidyltransferasu, který je zodpovědný za tvorbu peptidové vazby v nově vznikajícím proteinu.⁵⁷ Analogicky jako některá běžně používaná cytostatika narciklasin pravděpodobně interaguje nebo tvoří komplexy s molekulou DNA živočišných buněk. Studie z nedávné doby pak prokázala indukci apoptózy u buněk lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a buněk karcinomu prostaty PC-3

zprostředkovanou receptory smrti (death receptor 4- DR4), která byla zároveň doprovázena aktivací kaspas 8 a 9. Zajímavostí je, že narciklasin je až 250krát účinnější k nádorovým buňkám, než k primárním buňkám lidských fibroblastů Ccd-25-Lu.^{15, 58}

3.3.2.4 Tazettinový typ

Tazettin vykazuje pouze mírnou cytotoxickou aktivitu proti primárním buňkám fibroblastické linie LMTK a bohužel také velmi slabou aktivitu na leukemické buňky Rauscher.

Pretazettin vykazuje vysokou cytostatickou účinnost na buňkách myšního i lidského lymfomu. Patří mezi nejúčinnější alkaloidy působící proti T-lymfoidním buňkám MOLT-4. Během *in vitro* experimentů vykazoval vysokou aktivitu na buňky Rauscher leukemie, Lewisova karcinomu a spontánní AKR lymfocytární leukemie. Byla prokázána inhibice HeLa buněk po expozici pretazettinem. Dále bylo také prokázáno, že pretazettin inhibuje aktivitu P-gp a také zvyšuje účinek doxorubicinu proti rezistentním lymfoidním buňkám u myši.^{15, 59}

3.3.3 Antiplasmodiální aktivita

Malárie je nejčastěji importovaná protozoální tropická choroba, se kterou se můžeme setkat jak u běženců z endemických oblastí, tak u turistů. K přenosu a šíření malárie je důležitý prvek *Plasmodium*, a vektorem choroby je samička komára rodu *Anopheles*. Pro člověka jsou patogenní 4 paraziti; *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* a *Plasmodium ovale*.^{60, 61}

Lykorin, ungeremin a haemanthamin jsou nejúčinnější alkaloidy jak proti chlorochin-rezistentním, tak proti chlorochin-citlivým kmenům *P. falciparum*. V roce 2013 bylo testováno 27 lykorinových derivátů pro inhibiční aktivitu proti *Trypanosoma brucei* a *Plasmodium falciparum*. Proti původci malárie vykazovali nejvyšší aktivitu v experimentech *in vitro*; 1-O-(3R)-hydroxybutanoyllykorin, 1,2-di-O-butanoyllykorin a 1-O-propanoyllykorin.⁶⁰

3.3.4 Antivirová aktivita

Významnou protivirovou aktivitu má zástupce amarylkovitých alkaloidů vykazuje lykorin. Lykorin je známý pro svou schopnost inhibice syntézy proteinů v eukaryotických buňkách, stejně tak jako v buněčných systémech ve kterých je proteosyntéza řízena

eukaryotickými ribozomy. Bylo zjištěno, že některé amarylkovité alkaloidy jako lykorin, haemanthamin, trisphaedrin a homolykorin mohou inhibovat replikaci viru lidské imunodeficiency 1 (HIV- 1) *in vitro*. Lykorin a homolykorin, stejně jako littoralin izolovaný z *Hymenocallis littoralis*, inhiboval HIV- 1 reverzní transkriptázu. Methanolový extrakt z kořenů *Crinum asiaticum*, které jsou známé pro obsah lykorinových alkaloidů, byl také studován pro svou aktivitu proti HIV- 1, kdy se prokázala jejich inhibice reverzní transkriptázy, nikoli však proteázy.⁴⁶

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím přečištěna destilací. Nejprve byl zachycen předek (asi 5 %; většinou pomocí vhodného azeotropu) a poté bylo vydestilováno cca 90% rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce Büchi Rotavapor R 114 vybavené vodní lázní Büchi Waterpath B- 480 při 40°C za sníženého tlaku.

4.1.2 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla provedena způsobem stupňovité eluce na Al_2O_3 neutrálním. Suspenze adsorbentu v rozpouštědle byla nalita do chromatografické kolony obvyklým způsobem. Na povrch sloupce byl nanesen vzorek rozpuštěný v malém množství rozpouštědla.

4.1.3 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna vzestupně v klasických komorách nasycených mobilní fází. Doba sycení komor byla stanovena na 20 minut.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla

Benzin, p.a. (Penta)

Cyklohexan, p.a. (Penta)

Diethylamin, p.a. (Penta)

Ethanol, p.a. (Penta)

Chloroform, p.a. (Penta)

Toluen, p.a. (Penta)

4.2.2 Chemikálie

Dusičnan bismutitý zásaditý, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

Jodid draselný, p.a. (Penta)

Kyselina vinná, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

4.2.3 Chemikálie a materiál použité ke stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

4.2.3.1 Chemikálie

10mM acetylthiocholin jodid (Sigma- Adrich)

10mM butyrylthiocholin jodid (Sigma- Adrich)

0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4; chemikálie pro přípravu pufru; dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lanchema); dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lanchema)

5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

Huperzin A, (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Galanthamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Adrich)

4.2.3.2 Materiál

Jako zdroj acetylcholinesterázy byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma. Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

4.2.4 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.2.5 Chemikálie a materiál použité pro stanovení antioxidační aktivity

Kvercetin, (Sigma-Aldrich)

Trolox, (Sigma-Aldrich)

4.2.6 Přístroj použitý pro stanovení antioxidační aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.2.7 Detekční činidla

Dragendorfovo činidlo modifikované dle Muniera⁶²

Slouží k detekci alkaloidů a jiných látek obsahujících v molekule vázaný dusík.

- *roztok A* byl připraven rozpuštěním 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
- *roztok B* byl připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.
- *zásobní roztok* byl získán smísením roztoku A a B v poměru 1: 1
- *činidlo* pro analýzu bylo připraveno rozpuštěním 5 ml kyseliny vinné v 50 ml vody a 5 ml zásobního roztoku

4.2.8 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: To-DEA 95: 5 (toluen, diethylamin)

S 2: cHx-DEA 95: 5 (cyklohexan, diethylamin)

4.2.9 Chromatografické adsorbenty

A 1: Oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii neutrální, Acros Organics, Brockmann I 50- 200 µm, deaktivovaný 6 % vody.

A 2: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck; 20 x 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii; tloušťka vrstvy 0,2 mm.

A 3: Silikagel LS 5/40 UV₂₅₄; pro preparativní TLC

4.3 Izolace

4.3.1 Biologický materiál

Čerstvé cibule rostliny *Nerine bowdenii* byly dodány komerčním prodejcem Lukon-Glads a.s. (Sadská, Česká republika). Verifikace byla provedena Prof. RNDr. Lubomírem

Opletalem, CSc. Vzorek drogy byl uložen v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

4.3.2 Příprava alkaloidního extraktu

10 kg čerstvých cibulí bylo 3x extrahováno s 11 l ethanolu při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Rozpouštědlo se následně odpařilo za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce (Heidolph Instruments; Laborota 20 Control). Zbytek se rozpustil s 2,2 l 2% kyseliny chlorovodíkové. Po odstranění neutrálních sloučenin diethyletherem (3x 3,3 l) se extrakt zalkalizoval 25% roztokem amoniaku a alkaloidy se extrahovaly ethylacetátem (3x 3,3 l). Po odpaření organického rozpouštědla bylo získáno 50 g alkaloidního extraktu. 10 mg tohoto extraktu bylo použito na testy cholinestrázových aktivit. Zbytek suchého extraktu se rozpustil v metanolu na konečnou koncentraci 1 mg/ml pro další analýzu.

4.3.3 Sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu *Nerine bowdenii*

4.3.3.1 Kolona

Adsorbent:	2 500 g Al_2O_3 desaktivovaný 6% vody
Frakce:	500 ml/ 15 min.
Mrtvý objem:	1 800 ml

50g alkaloidního extraktu *Nerine bowdenii* bylo smíseno s 200 g adsorbentu Al_2O_3 . Tímto byl připraven roztěr v poměru 1:4. Tato směs byla následně rozpuštěna ve 200 ml směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (1:1) a odpařena do sucha.

Připravený roztěr byl smísen s malým množstvím mobilní fáze $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (80: 20) a nanesen na chromatografickou kolonu obvyklým způsobem.

Na chromatografickou kolonu byl kontinuálně vléván eluent (mobilní fáze). Eluát byl jímán po frakcích konstantního objemu 500 ml. Složení eluovaných frakcí bylo sledováno pomocí analytické TLC a na základě jejich vyhodnocení byly jednotlivé frakce shodných alkaloidů spojovány. Vybrané frakce byly dále dočišťovány pomocí preparační TLC za účelem

získání čistých alkaloidů.

Průběh a výsledky sloupcové chromatografie jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 7: Sloupcová chromatografie- přehled frakcí a výtěžků

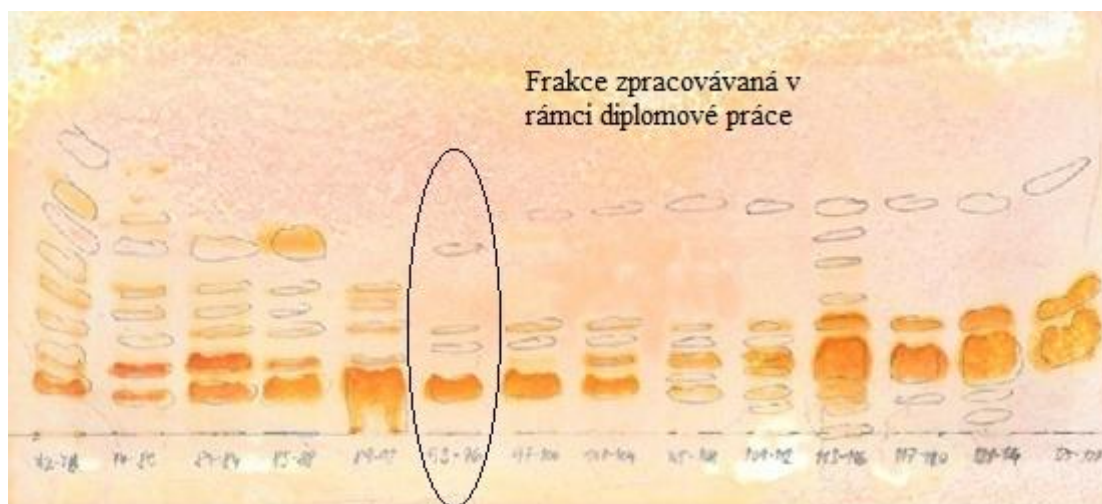
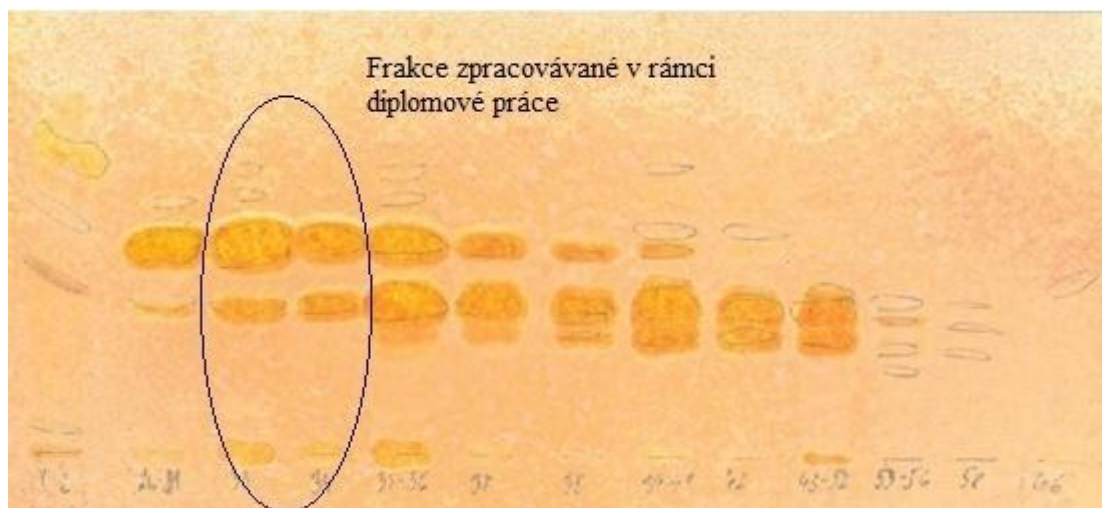
Číslo frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku
1- 7	benzín: CHCl ₃ (80: 20)	Bez obsahu alkaloidů
8- 12	benzín: CHCl ₃ (80: 20)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,02 g
13- 25	benzín: CHCl ₃ (80: 20)	Bez obsahu alkaloidů
26- 28	benzín: CHCl ₃ (80: 20)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 2,30 g
29- 32	benzín: CHCl ₃ (70: 30)	
33	benzín: CHCl ₃ (70: 30)	Hmotnost vzorku: 0,64 g
34	benzín: CHCl ₃ (70: 30)	Hmotnost vzorku: 0,55 g
35	benzín: CHCl ₃ (70: 30)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,84 g
36	benzín: CHCl ₃ (65: 35)	
37	benzín: CHCl ₃ (65: 35)	Hmotnost vzorku: 0,61 g
38	benzín: CHCl ₃ (65: 35)	Hmotnost vzorku: 0,48 g

39- 41	benzín: CHCl ₃ (65: 35)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,53 g
42	benzín: CHCl ₃ (65: 35)	Hmotnost vzorku: 0,47 g
43- 52	benzín: CHCl ₃ (60: 40)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 7,21 g
53- 56	benzín: CHCl ₃ (60: 40)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,70 g
57-58	benzín: CHCl ₃ (55: 45)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 4,3 mg
59-64	benzín: CHCl ₃ (55: 45)	Bez obsahu alkaloidů
65-67	benzín: CHCl ₃ (50: 50)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 9,7 mg
68-71	benzín: CHCl ₃ (50: 50)	Bez obsahu alkaloidů
72- 76	benzín: CHCl ₃ (50: 50)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,07 g
77- 80	benzín: CHCl ₃ (45: 55)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,10 g
81- 84	benzín: CHCl ₃ (45: 55)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,45 g
85- 88	benzín: CHCl ₃ (35: 65)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,56 g
89- 92	benzín: CHCl ₃ (35: 65)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 2,15 g

93- 96	benzín: CHCl ₃ (30: 70)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,72 g
97- 100	benzín: CHCl ₃ (30: 70)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,50 g
101- 104	benzín: CHCl ₃ (25: 75)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,19 g
105- 108	benzín: CHCl ₃ (25: 75)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,10 g
109- 112	benzín: CHCl ₃ (25: 75)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,12 g
113- 116	benzín: CHCl ₃ (20: 80)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,17 g
117- 120	benzín: CHCl ₃ (15: 85)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,51 g
121- 124	benzín: CHCl ₃ (15: 85)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,66 g
125- 128	benzín: CHCl ₃ (15: 85)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 0,90 g
129- 132	benzín: CHCl ₃ (10: 90)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,54 g
133- 136	benzín: CHCl ₃ (10: 90)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,05 g
137- 140	benzín: CHCl ₃ (10: 90)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,09 g
141- 144	benzín: CHCl ₃ (10: 90)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,51 g

145- 147	CHCl ₃ 100%	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,36 g
148- 150	CHCl ₃ 100%	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,11 g
151	CHCl ₃ 100%	Hmotnost vzorku: 8,79 g
152	CHCl ₃ : EtOH (50: 50)	Hmotnost vzorku: 6,88 g
153	CHCl ₃ : EtOH (50: 50)	Hmotnost vzorku: 9,73 g
154- 157	CHCl ₃ : EtOH (50: 50)	<u>Spojení frakcí</u> Hmotnost vzorku: 1,98 g

Po odpaření rozpouštědel a vysušení byla provedena souhrnná tenkovrstvá chromatografie všech 157 frakcí v elučním systému benzín + CHCl₃ (85: 15). Výsledky jsou znázorněny na obrázku 12.



Obrázek 12: Souhrnná TLC alkaloidních frakcí získaných metodou sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu *Nerine bowdenii* (adsorbent A2, dráha 7 cm, CHCl_3 + benzín (85: 15), vyvíjeno 2x, detekováno Dragendorfovým činidlem dle Muniera)

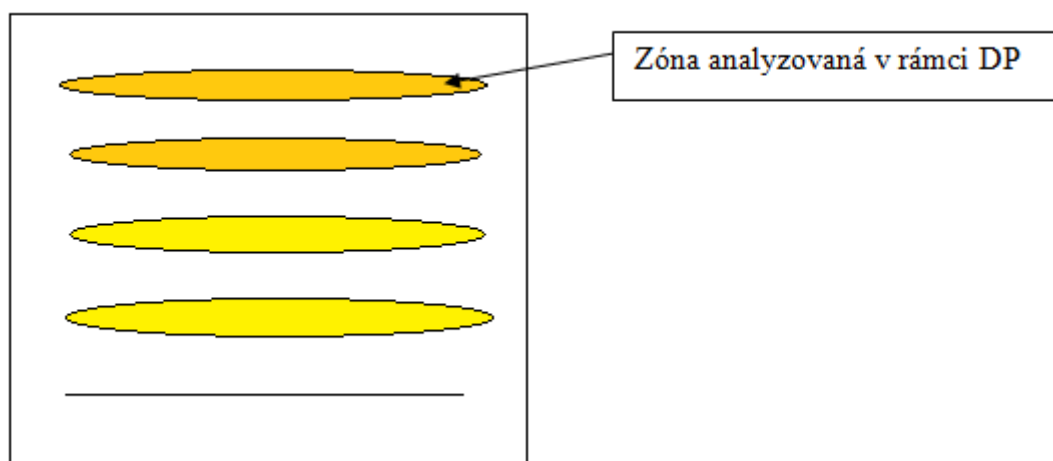
4.3.4 Zpracování frakce 93-96

Vzorek o hmotnosti 0,7163 g byl rozpuštěn v chloroformu. Po krystalizaci z horkého ethanolu byl vzorek podroben strukturní analýze. Bylo získáno 250 mg zkrystalizovaného čistého ambellinu.

4.3.5 Zpracování frakcí 33 a 34

Frakce 33 a 34 byly spojeny. 1,1914g žlutooranžové hmoty bylo rozpuštěno v chloroformu, nanесeno na 24 skleněných desek a následně podrobeno preparativní TLC na

vrstvě SiO₂. Vyvíjení jednotlivých desek probíhalo v soustavě S2, kterou jsme předem stanovili pomocí analytické TLC. V této soustavě byly jednotlivé desky vyvíjeny vředy 3x. Na základě UV detekce byly z desek vypreparovány 4 zóny. Všechny 4 zóny byly jednotlivě přečištěny následujícím způsobem; výškrab byl smísen s SiO₂, tato směs byla nanесena na kolonu a promyta směsí EtOH+ CH₃Cl (1:1), aby došlo k odstranění mechanických nečistot. Po odpaření rozpouštědla a krystalizaci byl vzorek zóny č.1 podroben strukturní analýze.



Obrázek 13: Preparativní TLC spojených frakcí 33 a 34

4.4 Určení struktury izolovaných látek

4.4.1 EI-MS analýza

Identifikace alkaloidů z rostliny *Nerine bowdenii* byla provedena na přístroji Agilent 7890 GC/MSD 5975 v režimu EI 70 eV. Byla použita kolona typu DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Teplotní režim byl 100–180°C s nárůstem 15°C/min, 1 min na 180°C, 180–300°C při 5°C/min a po dobu 5 min na 300°C, škála detekce *m/z* 40–600. Teplota při nanесení byla 280°C. Průtok nosného plynu (helium) byl 0,8 ml/min.³⁴

4.4.2 NMR analýza

NMR spektra byla měřena za laboratorní teploty na spektrofotometru VNMR S500 NMR, který pracuje o frekvenci 500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly zaznamenávány jako δ hodnoty v pars per milion (ppm) a jsou vztaženy k vnitřnímu standardu (tetramethylsilan; 7,26 ppm, v ^1H spektrech) nebo k signálu solventu (77,0 ppm, v ^{13}C spektrech).³⁴

4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

4.5.1 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 37°C
- v prostředí fosfátového pufru
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v mikrotitračních destičkách

4.5.2 Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvé odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta⁶³. Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50 ml zkumavek a třikrát promyty 5 mM fosfátovým puftrem (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5 mM fosfátovým puftrem (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým puftrem.

4.5.3 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB).⁶⁴ Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku tlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz: galanthaminem (IC₅₀ HuAChE = 1,71 ± 0,07 μM, IC₅₀ HuBuChE = 42,30 ± 1,30 μM), huperzinem A (IC₅₀ HuAChE = 0,3 ± 0,1 μM, IC₅₀ HuBuChE > 1000 μM), eserinem IC₅₀ HuAChE = 0,063 ± 0,001 μM, IC₅₀ HuBuChE = 0,130 ± 0,004 μM. % I (inhibice) byla vypočítána dle vzorce

$$\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100,$$

kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

4.6 Stanovení antioxidační aktivity čistých alkaloidů

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC₅₀), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3.02, a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem EC₅₀ = 11,11 ± 0,25 μM a troloxem EC₅₀ = 20,45 ± 1,31 μM.

4.7 Stanovení cytotoxické aktivity izolovaných alkaloidů

Toto měření nebylo stanovováno na našem pracovišti. Podrobný popis metody je možno nalézt v následující literatuře.⁶⁵

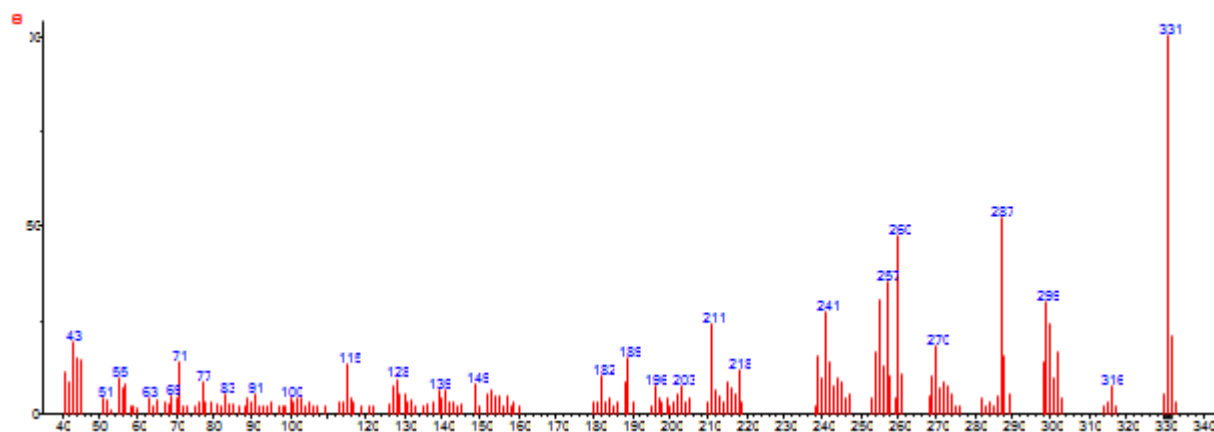
5 VÝSLEDKY

Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byly izolované alkaloidy identifikovány jako ambellin, undulatin a belladin. V rámci této diplomové práce byly sledovány výsledky testů biologických aktivit ambellinu a undulatinu.

5.1 Strukturní analýza ambellinu

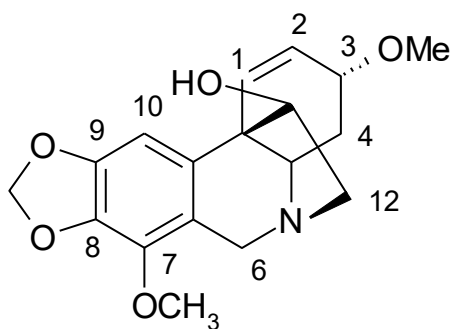
5.1.1 MS studie ambellinu

EI-MS, 70 eV, m/z (rel. int) 331(100), 316(5), 299(30), 287(55), 270(25), 260(50), 257(35), 255(23), 241(27).



Obrázek 14: EI-MS spektrum ambellinu

5.1.2 NMR studie ambellinu



Obrázek 15: struktura ambellinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře.

5.1.2.1 ^1H -NMR spektrum ambellinu

^1H NMR (499.9 MHz; δ , CDCl_3 , 25°C):

3.35 (3H, s, 3- OCH_3); 3.89 (1H, d, $J = 17$ Hz, H-6 α), 3.92 (3H, s, 7- OCH_3), 4.30 (1H, $J = 17$ Hz, H-6 β), 5.93 (2H, s, - $\text{O-CH}_2\text{-O-}$), 6.02 (1H, dd, $J_{1,2} = 10$ Hz, $J_{2,3} = 5$ Hz, H-2), 6.54 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-1), 6.59 (1H, s, H-10).

5.1.2.2 ^{13}C -NMR spektrum ambellinu

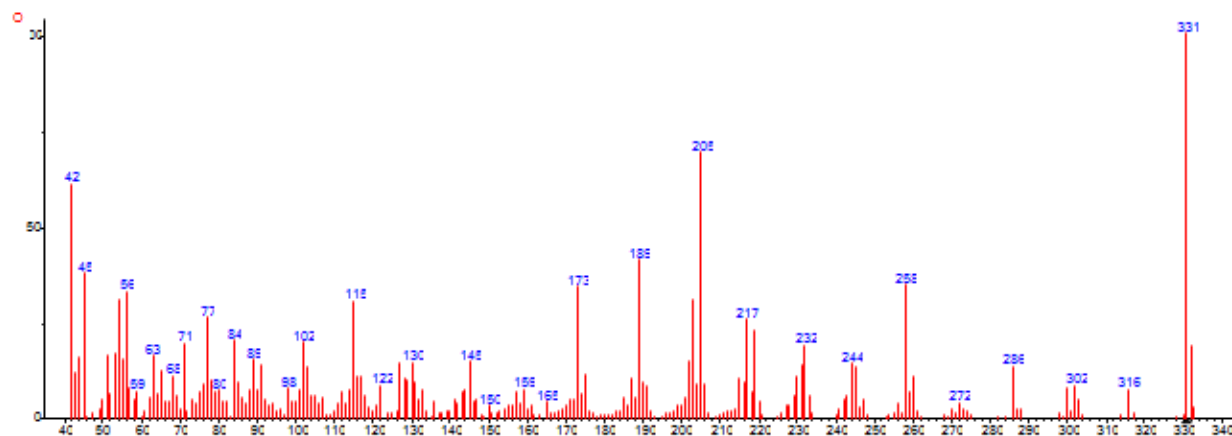
^{13}C NMR (125.7 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

148.27 (s, C-8), 141.27 (s, C-7), 134.47 (s, C-8), 132.12 (s, C-10a), 131.83 (d, C-2), 126.21 (d, C-1), 118.35 (s, C-6a), 100.80 (d, C-10), 100.34 (t, - $\text{O-CH}_2\text{-O-}$), 86.53 (d, C-3), 72.37 (d, C-11), 62.91, 62.59 (C-4a a C-12), 59.27, 59.17 (C-6 a - OCH_3), 56.51 (q, - OCH_3), 48.20 (s, C-10b), 28.76 (t, C-4).

5.2 Strukturní analýza undulatinu

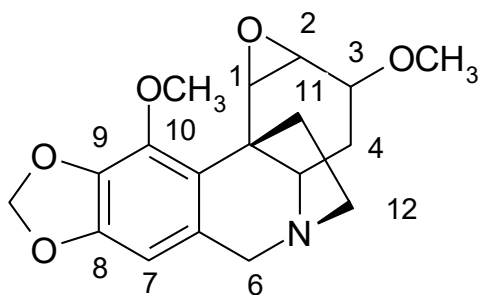
5.2.1 MS studie undulatinu

EI-MS, 70 eV, m/z (rel. int) 331(100), 316(6), 302(9), 300(6), 286(20), 272(5), 260(18), 258(40)



Obrázek 16: EI-MS spektrum undulatinu

5.2.2 NMR studie undulatinu



Obrázek 17: struktura undulatinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře.

5.2.2.1 ^1H -NMR spektrum undulatinu⁶⁶

^1H NMR (499.9 MHz; δ , CDCl_3 , 25°C):

3.42 (3H, s, 3- OCH_3), 3.69 (1H, d, $J = 17$ Hz, H-6 α), 3.96 (3H, s, 10- OCH_3), 4.21 (1H, d, $J = 17$ Hz, H-6 β), 5.86 (2H, s, OCH_2O), 6.62 (1H, s, H-7)

5.2.2.2 ^{13}C -NMR spektrum undulatinu⁶⁶

^{13}C NMR (125.7 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

148.08 (s, C-8), 141.09 (s, C-10), 139.07 (s, C-9), 133.39 (s, C-6a), 117.95 (s, C-10a), 100.6 (t, OCH_2O), 96.44 (d, C-7), 74.99 (d, C-3), 61.28 (d, C-4a), 59.04 (q, OCH_3), 58.71, 57.47, 55.11, 53.87, 52.60 (C-1,2,6,12 and OCH_3), 41.52 (s, C-10b), 39.31 (t, C-11), 25.31 (t, C-4).

5.3 Inhibiční aktivita vůči HuAChE a HuBuChE

Izolované alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči humánní erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 8: *In vitro* inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči HuAChE a HuBuChE

Látka	IC_{50} (μM) [*]	
	HuAChE	HuBuChE
Undulatin	$23,52 \pm 1,19$	>1000
Ambellin	169 ± 7	985 ± 25
galanthamin ^{**}	$1,71 \pm 0,07$	$42,30 \pm 1,30$
huperzin A ^{**}	$0,033 \pm 0,001$	>1000
eserin ^{**}	$0,063 \pm 0,001$	$0,130 \pm 0,004$

^{*}každé měření bylo opakováno 3x, ^{**} referenční látka

5.4 Antioxidační aktivita

Získané alkaloidy byly testovány na antioxidační aktivitu. Výsledky této studie jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 9: Antioxidační aktivita izolovaných alkaloidů (DPPH test)

Látka	EC ₅₀ (μM) [*]
ambellin	>1000
undulatin	>1000
kvercetin ^{**}	11,11 ± 0,25
trolox ^{**}	20,45 ± 1,31

^{*}každé měření bylo opakováno 2x, ^{**}referenční látka

5.5 Cytotoxická aktivita

Ve spolupráci s Katedrou biologických a biochemických věd, Fakulty chemicko-technologické, University Pardubice byla testována cytotoxická aktivita ambellinu. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce. Studie týkající se cytotoxické aktivity undulatinu, jsou momentálně ve fázi měření.

Tabulka 10: Cytotoxická aktivita ambellinu-hodnoty IC₅₀ pro buňky lidského adenokarcinomu prsu SK-BR-3 po 48 hod.

Látka	IC ₅₀ (μM)
ambellin	>50
cis platina [*]	27

^{*}referenční látka

6 DISKUSE A ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce byla příprava alkaloidního extraktu rostliny *Nerine bowdenii* a zpracování dvou frakcí za účelem izolace alespoň 2 alkaloidů v čisté formě a příprava jejich vzorků na testy biologických aktivit. Metodou sloupcové chromatografie a následně metodou preparační TLC byly získány 2 alkaloidy v čisté formě; ambellin a undulatin. Na izolaci ostatních alkaloidů z frakce 33 a 34 bych ráda pracovala v rámci rigorózního řízení. Obě izolované látky jsou známé a byly z *Nerine bowdenii* izolovány již dříve.⁶⁷

Vzorky těchto alkaloidů byly podrobeny testu inhibiční aktivity vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE Ellmanovou spektrofotometrickou metodou⁶⁴, dále pak testu na stanovení antioxidační a cytotoxické aktivity.

V testu na stanovení inhibiční aktivity vůči lidské erytrocytární AChE a sérové BuChE byly jako standardy použity galanthamin, huperzin A a eserin. O galanthaminu, dlouhodobě působícím selektivním reverzibilním a kompetitivním inhibitoru AChE, je pojednáno v příslušném oddílu této diplomové práce. Huperzin A, poprvé izolovaný v roce 1986 z plavuně *Huperzia serrata* (*Lycopodiaceae*), je silný reverzibilní inhibitor AChE, který je v současné době využíván k léčbě AD v Číně.⁶⁸ V dalších zemích je zatím ve 2. stádiu klinických studií. Eserin, též známý jako fyzostigmin, pochází z rostliny *Physostigma venenosum* (*Fabaceae*) a je nejdéle známým inhibitorem AChE. Jedná se o krátkodobě působící inhibitor AChE a BuChE a nachází uplatnění při mírnění symptomů AD.⁶⁹ Při sledování inhibiční aktivity vůči HuAChE, vykazoval lepší výsledky undulatin, u něhož byly naměřeny hodnoty $IC_{50, HuAChE} = 23,52 \pm 1,19 \mu M$. HuBuChE undulatin neinhiboval. Slibné výsledky vykazoval undulatin i ve studii³⁴ publikované v roce 2013 kde byl spolu s dalšími 10 alkaloidy čeledi Amaryllidaceae testován na inhibiční aktivitu vůči HuAChE, HuBuChE a POP. POP je cytosolová serinová peptidáza, která má schopnost štěpit malé peptidy obsahující ve své molekule aminokyselinu prolin. Inhibicí POP dochází ke zpomalení degradace neuropeptidů, které fungují mimo jiné také jako modulátory kognitivních funkcí, a tím ke zpomalení procesu stárnutí a zlepšení prognózy pacientů s AD.⁴⁸ V rámci studie byly naměřeny hodnoty $IC_{50, HuAChE} = 23 \pm 1 \mu M$ a $IC_{50, POP} = 1,96 \pm 0,12 \mu M$. Undulatin vykazoval jako jediný z testovaných látek relativně dobrou inhibiční aktivitu blížící se

inhibiční aktivitě použitého standardu baikalinu ($IC_{50, POP} = 0,610 \pm 0,021 \mu M$).³⁴ Galanthamin používaný v terapii AD tuto aktivitu nevykazuje. To svědčí o vysokém potenciálu undulatinu při hledání a vývoji nových aktivních látek pro léčbu AD.

Při stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity ambellinu byly získány následující hodnoty; $IC_{50, HuAChE} = 169 \pm 7 \mu M$ a $IC_{50, HuBuChE} = 985 \pm 25 \mu M$. Ambellin vykazuje pouze slabou inhibiční aktivitu vůči HuAChE a jen zanedbatelnou inhibiční aktivitu vůči HuBuChE.

Při AD vzniká v místech amyloidních plaků sterilní zánět, který způsobuje mimo jiné také uvolňování kyslíkových radikálů. Proto byly izolované alkaloidy podrobeny testu na stanovení antioxidační aktivity. Antioxidanty jsou přirozeně se vyskytující nebo syntetické látky, které inhibují nebo zpomalují škodlivé oxidační procesy v buňkách a tím mohou zabránit nebo oddálit poškození buněk. Při stanovení byly jako standardy použity kvercetin a trolox. Kvercetin patří mezi flavonoly a stejně jako mnoho jiných fenolických heterocyklických sloučenin vykazuje antioxidační účinek. Široce se vyskytuje v rostlinách ve formě glykosidu známý jako rutin. Trolox je ve vodě rozpustný derivát vitamínu E se silnými antioxidačními vlastnostmi. Je běžně používán jako standard v testech na stanovení antioxidační aktivity.^{70, 71} Při stanovení byly naměřeny hodnoty EC_{50} ambellinu i undulatinu $>1000 \mu M$, z čehož vyplývá, že jsou tyto látky v tomto směru nepoužitelné.

Při testování cytotoxické aktivity ambellinu proti buňkám lidského adenokarcinomu prsu SK-BR-3, které proběhlo ve spolupráci s katedrou biologických a biochemických věd, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice, byly u naměřeny hodnoty $IC_{50} >50 \mu M$, jako standard byla použita cis platina. Získané hodnoty naznačují, že ambellin nemá potenciál k využití v léčbě těchto typů nádorů. Testování cytotoxické aktivity undulatinu zatím probíhá, proto nejsou jeho výsledky v rámci této diplomové práce uvedeny.

Dle WHO a Alzheimer's Disease International se v současnosti počet osob s demencí odhaduje na 38 milionů. Toto číslo se dle prognóz v roce 2030 zdvojnásobí a do roku 2050 více než ztrojnásobí. V roce 2050 bude podle těchto odhadů žít na světě přibližně 115 milionů osob trpících demencí. V roce 2010 bylo Světovou zdravotnickou organizací zjištěno 7,7 milionů

nových případů demence. Celosvětové náklady na léčbu tohoto onemocnění v roce 2010 dosáhly 604 miliard USD.⁷² Z výše uvedených informací vyplývá, že situace ohledně prevalence tohoto onemocnění je více než závažná, proto je zapotřebí se, v zájmu péče o všeobecné zdraví a zvyšování kvality života, tímto tématem nadále zabývat a pokračovat v hledání nových účinných látek z řad rostlinných metabolitů, které by mohly následovat galanthamin jakožto léky používané k léčbě AD.

7 LITERATURA

1. Jahodář L. *Farmakobotanika*. 1. vydání, Karolinum, Praha 2012, 235 s.
2. Nair J, Campbell WE, Braun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (2005) Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry*, **66**, 373-382.
3. Jiráček R. (2009) Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie*, **5**, 176-178.
4. Vališ M, Kalnická D. (2011) Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurologie pro praxi*, **12**(1), 33-36.
5. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Barevný atlas farmakologie*. 4. vydání, Grada, Praha 2012, 366 s.
6. Brunovský M, (2007) Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*, **2**, 112-117.
7. <http://www.britannica.com>, stařeno 1. dubna 2014.
8. Heinrich M. v knize: *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. 4. kap, 1. vydání, Elsevier, Oxford **2010**. 419 s.
9. Duncan G. (2002) The genus *Nerine*. *Bulbs*, **1**(4), 9-14.
10. <http://www.pacificbulbsociety.org>, stařeno 22. března 2014.
11. <http://www.botany.cz>, stařeno 22. března 2014.
12. <http://www.inetgardens.com>, stařeno 22. března 2014.
13. Bastida J, Berkov S, Torras L, Belén Pigni N, de Andrade JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F. (2011) Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 65-100.
14. Polya G. *Biochemical targets of plant bioactive compounds*. CRC Press, USA **2003**, 838 s.

15. Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. (2013) Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, **107**, 701-708.
16. Herbert RB. *The biosynthesis of secondary metabolites*, 2. vydání, Chapman & Hall, London **1989**, 248 s.
17. Bastida J, Viladomat F, Codina C. (1998) *Narcissus* alkaloids. *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier: Amsterdam, svazek 20, 323-400.
18. Krejčová G, Ševelová L. (2003) Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy*, **1**, 37-44.
19. Ikeda T, Taylor WI, Tsuda Y, Uyeo S, Yajima H. (1956) The structure and stereochemistry of tazettine. *Journal of Chemical Society*, 4749-4761.
20. Wildman WC, Bailey DT. (1967) Pretazettine. *Journal of American Chemical Society*, **89**(21), 5514-5515.
21. Pelletier WS. *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*. 1. vydání, Elsevier, Oxford **2001**. 635 s.
22. Cedrón JC, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Gutiérrez D, Flores N, Bucio MA, Pérez-Hernández N, Joseph-Nathan P. (2009) Bioactive montanine derivatives from halide-induced rearrangements of haemanthamine-type alkaloids. Absolute configuration by VCD. *Organic Letters*, **11**(7), 1491-1494.
23. Fales HM, Wildman WC, (1960) The Structures of haemanthamine and crinamine. *Journal of the American Chemical Society*, **82**(1), 197-205. (mohu dohledat pouze abstrakt, mám si tedy najít jiný zdroj?)
24. Evidente A, Kireev AS, Jenkins AR, Romero AE, Steelant WFA, van Slambrouck S, Kornienko A. (2009) Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Medica*, **75**(5), 501-507.

25. Jin Z. (2013) Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*, **30**, 849-868.
26. Khan M., Ather A.: *Lead Molecules from Natural Products: Discovery and New Trends*. 1. vydání, Elsevier, Oxford **2006**. 430 s.
27. Luchetti G, Johnston R, Mathieu V, Lefranc F, Hayden K, Andolfi A, Lamoral-Theys D, Reisenauer MR, Champion C, Pelly SC, van Otterlo WAL, Magedov IV, Kiss R, Evidente A, Rogelj S, Kornienko A. (2012) Bulbispermine. A crinine-type alkaloid exhibiting cytostatic activity toward apoptosis-resistant glioma cells. *ChemMedChem*, **7**(5), 815-822.
28. Buckingham J, Baggaley KH, Roberts AD, Szabó LF. *Dictionary of alkaloids*. 2. vydání, CRC Press, USA 2010, 2290 s.
29. <http://www.sarahraven.com>, stařeno 22. března 2014.
30. Cahlíková L, Beneřová N, Macáková K, Kučera R, Hrstka V, Klimeř J, Jahodář L. (2012) Alkaloids from some Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **7**(5), 571-574.
31. Willaman JJ, Schubert GB. v knize: *Alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids*. str. 20-21, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C. **1961**, 287 s.
32. Stefanizzi L, (1980) Structure embryology cytochemical localization of the alkaloids of *Nerine undulata*. *Fitoterapia*, **51**(4), 211-222
33. Cahlíková L, Beneřová N, Macáková K, Urbanová K, Opletal L. (2011) GC/MS analysis of free Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **6**(9), 1255-1258.
34. Cahlíková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Beneřová N, Chlebek J, Jun D, Novák Z, Macáková K, Kuneř J, Kuča K, Opletal L. (2013) Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prollyl oligopeptidase activities. *Natural Product Communications*, **8**(11), 1541-1544.
35. <http://www.jparkers.co.uk>, stařeno 22. března 2014.
36. <http://www.growingwithplants.com>, stařeno 22. března 2014.

37. <http://www.dobies.co.uk>, stař eno 22. března 2014.
38. <http://www.pacificbulbsociety.org>, stař eno 22. března 2014.
39. <http://www.shire.co>, stař eno 22. března 2014.
40. Ressner P. (2004) Alzheimerova choroba: Diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, **1**, 11-16.
41. Lopéz S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, **71**(21), 2522-2529.
42. Ortiz JE, Berkov S, Pigni NB, Theoduloz C, Roitman G, Tapia A, Bastida J, Feresin GE. (2012) Wild argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the Acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. *Molecules*, **17**(11), 13473-13482.
43. Zvolský P. (2001) Demence. *Interní medicína pro praxi*, **11**, 15-19.
44. Cahlíková L, Macáková K, Benešová N, Chlebek J, Hošťálková A, Opletal L. Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: a critical review. *Studies in Natural Chemistry*, kap. 6, Elsevier: Amsterdam **2014**, str. 153-194.
45. Lilienfeld S. (2002) Galanthamine a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Reviews*, **8**(2), 159-176.
46. Reyes-Chilpa R, Berkov S, Hernández-Ortega S, Jankowski ChK, Arseneau S, Clotet-Clodina I, Este JA, Codina C, Viladomat F, Bastida J. (2011) Acetylcholinesterase inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, **16**(11), 9520-9533.
47. Xin L, Yamujala R, Wang Y, Wang H, Wu WH, Lawton MA, Long Ch, Di R. (2013) Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Lycoris radiata* delay paralysis of amyloid beta-expressing transgenic *C. elegans* CL4176. *Plos One*, **8**(5), 1-8.

48. Puttonen KA, Lehtonen S, Raasmaja A, Männistö PT. **(2006)** A prolyl oligopeptidase inhibitor Z-Pro-Prolinal inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Toxicology in Vitro*, **20**, 1446-1454.
49. Toide K, Shinoda M, Fujiwara T, Iwamoto Y. **(1997)** Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **56**, 427-434.
50. Evdokimov NM, Lamoral-Theys D, Mathieu V, Andolfi A, Frolova LV, Pelly SC, Otterlo WAL, Magedov IV, Kiss R, Evidente A, Kornienko A. **(2011)** Cytostatic agent derived from the alkaloid Lycorine: Synthesis and growth inhibitory properties of lycorine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **19**(23), 7252-7261.
51. Lamoral-Theys D, Andolfi A, van Goietsenoven G, Cimmino A, Le Calvé B, Wauthoz N, Mégalizzi V, Bruyère TGC, Dubois J, Mathieu V, Kornienko A, Kiss R, Evidente A. **(2009)** Lycorine, the main phenanthridine amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant anti-tumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: An investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**(20), 6244-6256.
52. Chase MW, Reveal JL, Fay MF. **(2009)** A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **2**(161), 132-136.
53. Griffin C, Sharda N, Sood D, Nair J, McNulty J, Pandey S. **(2007)** Selective cytotoxicity of pancratistatin-related natural Amaryllidaceae alkaloids. *Cancer Cell International*, **7**(10), 1-7.
54. Ma D, Tremblay P, Mahngar K, Collins J, Hudlicky T, Padley S. **(2011)** Selective cytotoxicity against human osteosarcoma cells by a novel synthetic C-1 analogue of 7-deoxypancratistatine is potentiated by curcumin. *Plos One*, **6**(12), 1-14.
55. Griffin C, Karnik A, McNulty J, Pandey S. **(2011)** Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, **10**(1), 57-68.

56. Siedlakowski P, McLachlan-Burgess A, Griffin C, Tirumalaj SS, McNulty J, Pandey S. **(2008)** Synergy of pancratistatin and tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer Biology and Therapy*, **7**(3), 376-384.
57. Jimenez A, Santos A, Alonso G, Vazquez D. **(1976)** Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochim Biophys Acta*, **425**(3), 342-348.
58. Dumont P, Ingrassia L, Rouzeau S, Ribaucour F, Thomas S, Roland I, Darro F, Lefranc F, Kiss R. **(2007)** The Amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*, **9**(9), 766-776.
59. Zupkó I, Rethy B, Höhmann J, Molnár J, Ocsóvszki I, Falkay G. **(2009)** Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *International Journal of Experimental and Clinical Patopsychology and Drug Research*, **23**(1), 41-48.
60. Cedrón JC, Gutierrez D, Flores N, Ravelo AG, Estevez-Braun A. **(2013)** Preparation and antimalarial activity of semisynthetic lycorenine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 722-730.
61. Fendrich Z. **(2005)** Malárie a její léčba. *Klinická farmakologie a farmacie*, **19**, 89-94.
62. Stahl E. *Thin-layer chromatography: A laboratory handbook*. 2. vydání, Springer Verlag, Berlin **1969**, 1096 s.
63. Steck T, Kant JA. **(1974)** Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymology*, **31**, 172-180.
64. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM **(1961)** A new rapid colorimetric determinativ of acetylcholinesterase aktivity. *Biochemistry Pharmacology*, **7**, 88-95.
65. Havelek R, Seifrtová M, Kralovec K, Brůčková L, Cahlíková L, Dalecká M, Vávrová J, Řezáčová M, Opletal L, Bílková Z. **(2014)** The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53- negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*, **21**, 479-490.

66. Pettit GR, Gaddamidi V, Goswami A, Cragg GM. (1984) Antineoplastic agents: *Amaryllis belladonna*. *Journal of Natural Products*, **47**(5), 796-801.
67. Boit HG, Ehmke H. (1956) Amaryllidaceous alkaloids XII. The alkaloids from *Nerine bowdenii*, *Crinum powellii*, *Amaryllis belladonna* and *Pancratium maritimum*. *Chemische Berichte*, **89**, 2093-2097.
68. Martin J, Kršková Z, Dušek J. (2011) Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*, **7**(1), 39-41.
69. Triggle D, Mitchell JM, Filler R. (1998) The Pharmacology of Physostigmine. *CNS Drug Reviews*, **4**(2), 87-136.
70. <http://www.biovision.com>, stařeno 18. dubna 2014
71. Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.
72. Povová J.: *Disertační práce*. Epidemiologie a genetika Alzheimerovy choroby. Univerzita Palackého v Olomouci, Ostrava **2013**.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholin
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesteráza
cHx	cyklohexan
DEA	diethylamin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2'-difenyl-1-pykrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EC	účinná koncentrace
EI-MS	elektronová ionizační hmotnostní spektrometrie
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC-MS	plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie
HIV	virus lidské imunodeficiency
HuAChE	lidská acetylcholinesteráza
HuBuChE	lidská butyrylcholinesteráza
ChAT	cholin-acetyltransferáza
IC	inhibiční koncentrace
L-phe	L-fenylalanin
L-tyr	L-tyrosin
MS	hmotnostní spektrometrie
NFT	N-terminální fragment
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
POP	prolyloligopeptidáza
RAGE	receptor for advance glycan end

RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní forma kyslíku
TLC	tenkovrstvá chromatografie
To	toluen
USA	Spojené státy americké
USD	Americký dolar
UV	ultra fialový
WHO	Světová zdravotnická organizace
A β	β -amyloid

ABSTRAKT

Mišáková K: Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* a jejich biologická aktivita 1. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2014, 63 s.

Předmětem diplomové práce byla příprava alkaloidního extraktu z rostliny *Nerine bowdenii*, za účelem izolace 2 alkaloidů v čisté formě metodou sloupcové chromatografie a následně metodou preparační tenkovrstvé chromatografie. Vzorky byly podrobeny strukturní MS a NMR analýze a testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám (HuAChE a HuBuChE), na antioxidační a cytotoxickou aktivitu. Izolované látky byly identifikovány jako ambellin a undulatin. Přítomnost těchto alkaloidů byla u rostliny *Nerine bowdenii* popsána již dříve.

Při testu na stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity ambellinu a undulatinu byly naměřeny tyto hodnoty; pro ambellin: $IC_{50, \text{HuAChE}} = 169 \pm 7 \mu\text{M}$ a $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 985 \pm 25 \mu\text{M}$, pro undulatin: $IC_{50, \text{HuAChE}} = 23,52 \pm 1,19 \mu\text{M}$ a $IC_{50, \text{HuBuChE}} > 1000 \mu\text{M}$. Jako standardy byly použity galanthamin ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 1,71 \pm 0,007 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), huperzin A ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} > 1000 \mu\text{M}$) a eserín ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$).

Při testu na stanovení antioxidační aktivity ambellinu a undulatinu byly naměřeny hodnoty pro ambellin i undulatin $EC_{50} > 1000 \mu\text{M}$. Jako standardy byly použity kvercetin ($EC_{50} = 11,11 \pm 0,25$) a trolox ($EC_{50} = 20,45 \pm 1,31$). Ve spolupráci s katedrou biologických a biochemických věd, Fakulty chemicko-technologické, University Pardubice byla testována cytotoxická aktivita ambellinu; $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$. Jako standard byla použita cis platina ($IC_{50} = 27 \mu\text{M}$).

Klíčová slova: *Nerine bowdenii*, *Amaryllidaceae*, Alzheimerova choroba, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, ambellin, undulatin

ABSTRACT

Mišáková K: Alkaloids of the Amaryllidaceae family and their biological activity 1.

Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2014, 63 p.

The aim of the diploma thesis was a preparation of alkaloidal extract from *Nerine Bowdenii* to isolation of 2 pure alkaloids by column and thin layer chromatography. Subsequently these two alkaloids were subjected to structural MS and NMR analysis and tested for biological activity against human cholinesterases (HuAChE and HuBuChE) and for antioxidant and cytotoxic activity. Isolated substances were identified as ambelline and undulatine alkaloids, which have been already described previously in this plant. In the test for determining cholinesterase inhibitory activity of ambelline and undulatine the following values were measured; for ambelline: $IC_{50, \text{HuAChE}} = 169 \pm 7 \mu\text{M}$ a $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 985 \pm 25 \mu\text{M}$, for undulatine: $IC_{50, \text{HuAChE}} = 23,52 \pm 1,19 \mu\text{M}$ a $IC_{50, \text{HuBuChE}} > 1000 \mu\text{M}$. Galanthamin ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 1,71 \pm 0,007 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), huperzin A ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} > 1000 \mu\text{M}$) and eserine ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$) were used like a positive controls.

In the test for determining antioxidant activity of ambelline and undulatine the following values for ambelline and undulatine were measured; $EC_{50} > 1000 \mu\text{M}$. Quercetine ($EC_{50} = 11,11 \pm 0,25$) and trolox ($EC_{50} = 20,45 \pm 1,31$) were used like a positive controls.

In cooperation with the Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, cytotoxic activity of ambelline was tested; $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$. Cis platinum ($IC_{50} = 27 \mu\text{M}$) was used as standard.

Keywords: *Nerine bowdenii*, *Amaryllidaceae*, Alzheimer disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, ambelline, undulatine